



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116134131 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 16

(21) 申请号 202080097486.9

(22) 申请日 2020.12.30

(30) 优先权数据

62/955,801 2019.12.31 US

62/992,700 2020.03.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/067506 2020.12.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/138447 EN 2021.07.08

(71) 申请人 伊利克斯根治疗公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 M·S·H·柯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

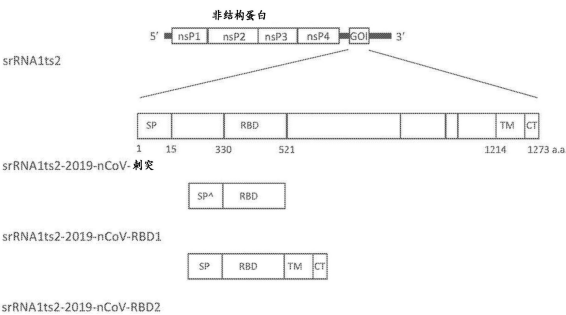
权利要求书7页 说明书47页
序列表16页 附图33页

(54) 发明名称

核酸和蛋白质向细胞和组织的基于温度的
瞬时递送

(57) 摘要

本公开文本涉及用于在一个或多个细胞中
瞬时激活温度敏感性药剂的方法,例如通过使一个或多个细胞与温度敏感性药剂接触并在允许温度下瞬时孵育所述细胞以诱导所述细胞中温度敏感性药剂的活性。另外,本公开文本涉及使受试者中的一个或多个细胞与温度敏感性药剂接触,然后将所述受试者的核心体温降低至允许温度以诱导所述细胞中温度敏感性药剂的活性的方法。本公开文本还涉及使受试者中的一个或多个细胞与温度敏感性药剂接触从而将受试者的表面体温维持在允许温度以诱导所述细胞中温度敏感性药剂的活性的方法。还公开了用温度敏感性治疗剂治疗受试者的方法。



1. 一种用于在受试者中刺激针对病原体的免疫应答的免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含赋形剂和温度敏感性药剂(ts药剂),其中所述ts药剂是编码所述病原体的抗原的温度敏感性病毒载体或温度敏感性自我复制RNA,并且其中所述ts药剂能够在允许温度下表达所述抗体但在非允许温度下不表达所述抗原。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病原体包括病毒、细菌、原生动物和真菌中的一种或多种。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述抗原包含所述病原体的表面蛋白或其片段。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述病原体是病毒,并且所述病毒不同于所述病毒载体。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述病毒是冠状病毒并且所述抗原包含所述冠状病毒的刺突蛋白或其片段。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述冠状病毒是2019-nCoV并且所述抗原包含所述2019-nCoV的受体结合结构域(RBD)。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述RBD的氨基酸序列包含SEQ ID NO:44,或与SEQ ID NO:44至少75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

8. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述冠状病毒是2019-nCoV并且所述抗原包含所述刺突蛋白的胞外区,所述胞外区包含SEQ ID NO:41的残基16-1213的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41至少75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中所述允许温度是30℃至36℃、或31℃至35℃、或32℃至34℃、或33℃±0.5℃,所述非允许温度是37℃±0.5℃。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述ts药剂是温度敏感性自我复制RNA。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述自我复制RNA包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

14. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述ts药剂是温度敏感性病毒载体。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

17. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述病毒载体是仙台病毒。

18. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述受试者是人且所述病原体是人病原体。

19. 一种用于在哺乳动物受试者中刺激针对病原体的免疫应答的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用根据权利要求18所述的免疫原性组合物以在所述哺乳动物受试者中刺激针对所述抗原的免疫应答,其中所述哺乳动物受试者是人受试者。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中将所述免疫原性组合物:

- i) 皮内或皮下施用;或
- ii) 肌肉施用。

21. 根据权利要求19所述的方法, 其中将所述免疫原性组合物鼻内施用。

22. 一种温度敏感性药剂, 其中所述药剂是温度敏感性病毒载体或温度敏感性自我复制RNA, 其包含插入12-18个核苷酸的非结构蛋白编码区, 其中所述插入导致在所述nsP2的 β 片层5与 β 片层6之间包含4至6个另外的氨基酸的非结构蛋白2 (nsP2=解旋酶蛋白酶) 的表达, 任选地其中所述另外的氨基酸导致所述病毒载体或所述自我复制RNA的温度敏感性。

23. 根据权利要求22所述的温度敏感性药剂, 其中所述另外的氨基酸包含选自SEQ ID NO:38(GCGRT)、SEQ ID NO:39(TGAAA)和SEQ ID NO:40(LRPHP)的一个序列。

24. 根据权利要求22所述的温度敏感性药剂, 其中所述另外的氨基酸包含SEQ ID NO:39(TGAAA)的序列。

25. 根据权利要求24所述的温度敏感性药剂, 其中所述NsP2的氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:29-36的一个序列。

26. 根据权利要求22所述的温度敏感性药剂, 其中所述药剂是温度敏感性甲病毒载体。

27. 根据权利要求22所述的温度敏感性药剂, 其中所述药剂是包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子的温度敏感性自我复制RNA。

28. 根据权利要求26或权利要求27所述的温度敏感性药剂, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

29. 根据权利要求26或权利要求27所述的温度敏感性药剂, 其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

30. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂(ts药剂)的温度敏感性活性的方法, 其中所述受试者的身体表面处或附近的一个或多个细胞包含所述ts药剂, 其中所述ts药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度是所述受试者的表面体温, 所述方法包括:

i) 将所述受试者的表面体温在所述允许温度下维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果; 以及

ii) 将所述受试者的表面体温升高至非允许温度, 持续一定的时间段, 所述时间段足以使所述受试者中的所述温度敏感性活性停止。

31. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂(ts药剂)的温度敏感性活性的方法, 其中所述ts药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度是所述受试者的表面体温, 所述方法包括:

i) 将所述ts药剂施用至所述受试者的身体表面处或附近的一个或多个细胞; 以及

ii) 将所述受试者的表面体温在所述允许温度下维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果。

32. 根据权利要求31所述的方法, 所述方法进一步包括iii) 将所述受试者的表面体温升高至非允许温度, 持续一定的时间段, 所述时间段足以使所述受试者中的所述温度敏感性活性停止。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂皮内或皮下施用。

34. 根据权利要求31所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂肌内施用。

35. 根据权利要求30-34中任一项所述的方法, 其中所述允许温度是30℃至36℃、或31℃至35℃、或32℃至34℃、或33℃ $\pm$ 0.5℃, 所述非允许温度是37℃ $\pm$ 0.5℃。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中药剂由所述ts药剂的编码区编码或所述ts药剂包含药剂, 并且所述效果包括药物效果, 任选地其中所述药剂是治疗剂并且所述药物效果是治疗效果, 或其中所述药剂是预防剂并且所述药物效果是预防效果。

37. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述ts药剂是温度敏感性病毒载体并且所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性病毒载体的复制和转录。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

39. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是甲病毒, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

40. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是仙台病毒。

41. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述ts药剂是温度敏感性自我复制RNA, 并且所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性自我复制RNA的复制和转录中的之一或二者。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述自我复制RNA包含缺乏甲病毒病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

44. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

45. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述药剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

46. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述药剂包含蛋白质。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述蛋白质包含病原体的抗原。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述病原体包括病毒、细菌、原生动物和真菌中的一种或多种。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述抗原包含所述病原体的表面蛋白或其片段。

50. 根据权利要求36所述的方法, 其中足以使所述温度敏感性活性产生效果的所述时间段在约12小时至约12周的范围, 任选地其中所述时间段为1至7天。

51. 根据权利要求36所述的方法, 其中足以在所述受试者中诱导效果的所述时间段是约12小时至约7天, 任选地其中所述时间段是约12小时至约72小时。

52. 一种用于瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法, 所述方法包括:

i) 将包含所述温度敏感性药剂的一个或多个细胞在诱导所述温度敏感性活性的允许温度下孵育一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述一个或多个细胞中产生效果; 以及

ii) 在非允许温度下孵育所述一个或多个细胞, 其中所述非允许温度降低所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性,

其中所述温度敏感性药剂包括治疗剂, 并且所述效果包括治疗效果。

53. 根据权利要求52所述的方法, 所述方法进一步包括在步骤i) 之前: 使所述一个或多个细胞与所述温度敏感性药剂接触。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述一个或多个细胞在与所述温度敏感性药剂接触时处于所述允许温度下。

55. 根据权利要求52所述的方法, 所述方法进一步包括向需要所述治疗效果的受试者施用所述一个或多个细胞。

56. 根据权利要求52所述的方法, 其中在非允许温度下孵育所述一个或多个细胞包括向需要所述治疗效果的受试者施用所述一个或多个细胞, 其中所述受试者的体温是所述非允许温度。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中在向所述受试者施用所述一个或多个细胞之前, 将所述一个或多个细胞在所述非允许温度下进一步孵育。

58. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述一个或多个细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述治疗效果包括所述细胞分化成期望的细胞类型。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述期望的细胞类型选自神经元、神经胶质细胞和内皮细胞。

61. 根据权利要求53所述的方法, 其中在使所述一个或多个细胞与所述温度敏感性药剂接触之前将所述一个或多个细胞从所述受试者分离。

62. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法, 其中所述受试者的一个或多个细胞包含所述温度敏感性药剂, 其中所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度低于所述受试者的体温, 所述方法包括:

i) 将所述受试者的体温降低至所述允许温度;

ii) 将所述降低的体温维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果; 以及

iii) 将所述受试者的体温升高回正常体温。

63. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法, 其中所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度低于所述受试者的体温, 所述方法包括:

i) 将所述受试者的体温降低至所述允许温度;

ii) 向所述受试者的一个或多个细胞施用所述温度敏感性药剂;

iii) 将所述降低的体温维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果; 以及

iv) 将所述受试者的体温升高回正常体温, 其中步骤(i)在步骤(ii)之前、之后或同时进行。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂全身施用。

65. 根据权利要求64所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂静脉内施用。

66. 根据权利要求63所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂施用至所述受试者的特定组织或器官。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过硬膜外注射施用至脑和脊髓。

68. 根据权利要求66所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过经皮注射施用至靶

器官中。

69. 根据权利要求66所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过内窥镜检查使用注射针头导管施用至靶器官中。

70. 根据权利要求66所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过血管导管施用至靶器官中。

71. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述靶器官选自肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺、脾脏、心脏、脑、脊髓、皮肤、眼、肺、肠、胸腺、骨髓、骨和软骨。

72. 根据权利要求63所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过吸入施用。

73. 根据权利要求63所述的方法, 其中改变受试者的体温包括使用目标温度管理 (TTM) 程序, 其中所述TTM程序包括向所述受试者施加由冷却导管、冷却毯和冰块组成的组中的一种。

74. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述受试者是人。

75. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述温度敏感性药剂包括治疗剂, 并且所述效果包括治疗效果。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述治疗剂由温度敏感性病毒载体的异源核酸的编码区编码。

77. 根据权利要求76所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是甲病毒。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

80. 根据权利要求77所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是仙台病毒。

81. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述治疗剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

82. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述治疗剂是蛋白质。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述蛋白质是转录因子, 任选地其中所述转录因子选自人神经元素3 (NGN3) 和人ETS易位变体2 (ETV2)。

84. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述蛋白质是生长因子, 任选地其中所述生长因子选自脑源性神经营养因子 (BDNF) 和神经生长因子 (NGF)。

85. 根据权利要求76所述的方法, 其中所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性病毒载体的复制和转录。

86. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述治疗剂由温度敏感性自我复制RNA的编码区编码。

87. 根据权利要求86所述的方法, 其中所述自我复制RNA包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

89. 根据权利要求86所述的方法, 其中所述治疗剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

90. 根据权利要求86所述的方法,其中所述治疗剂是蛋白质。
91. 根据权利要求90所述的方法,其中所述蛋白质是转录因子,任选地其中所述转录因子选自人神经元素3(NGN3)和人ETS易位变体2(ETV2)。
92. 根据权利要求90所述的方法,其中所述蛋白质是生长因子,任选地其中所述生长因子选自脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)。
93. 根据权利要求86所述的方法,其中所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性自我复制RNA的复制和转录中的之一或二者。
94. 根据权利要求76所述的方法,其中所述编码区与启动子可操作地连接。
95. 根据权利要求75所述的方法,其中足以使所述温度敏感性活性产生治疗效果的所述时间段在约12小时至约12周的范围,任选地其中所述时间段为1至7天。
96. 根据权利要求75所述的方法,其中足以在所述受试者中诱导效果的所述时间段是约12小时至约7天,任选地其中所述时间段是约12小时至约72小时。
97. 根据权利要求52-96中任一项所述的方法,其中所述允许温度在30℃至36℃、或31℃至35℃或32℃至34℃的范围内。
98. 根据权利要求97所述的方法,其中所述允许温度是33℃±0.5℃。
99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述非允许温度是37℃±0.5℃。
100. 根据权利要求52所述的方法,其中所述一个或多个细胞是人细胞。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是成体干细胞、组织干细胞、祖细胞、胚胎干细胞或诱导多能干细胞。
102. 根据权利要求101所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞选自造血干细胞、间充质干细胞、脂肪干细胞、神经元干细胞和生殖干细胞。
103. 根据权利要求100所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是体细胞、成熟细胞或分化的细胞。
104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞选自表皮细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、肝细胞、上皮细胞、肌细胞、软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、胰腺细胞、胰腺β细胞、角质细胞、红细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、神经元、神经胶质细胞、神经细胞、星形胶质细胞、生殖细胞、精细胞和卵母细胞。
105. 根据权利要求100所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是人骨髓细胞。
106. 根据权利要求105所述的方法,其中所述人骨髓细胞选自造血干细胞、间充质干细胞和内皮干细胞。
107. 根据权利要求106所述的方法,其中所述造血干细胞是CD34+。
108. 根据权利要求97所述的方法,其中所述温度敏感性病毒载体或所述温度敏感性自我复制RNA包含插入12-18个核苷酸的非结构蛋白编码区,其中所述插入导致在所述nsP2的β片层5与β片层6之间包含4至6个另外的氨基酸的非结构蛋白2(nsP2=解旋酶蛋白酶)的表达,任选地其中所述另外的氨基酸导致所述病毒载体或所述自我复制RNA的温度敏感性。
109. 根据权利要求108所述的方法,其中所述另外的氨基酸包含选自SEQ ID NO:38(GCGRT)、SEQ ID NO:39(TGAAA)和SEQ ID NO:40(LRPHP)的一个序列。
110. 根据权利要求108所述的方法,其中所述另外的氨基酸包含SEQ ID NO:39(TGAAA)的序列。

111. 根据权利要求110所述的方法, 其中所述NsP2的氨基酸序列包含选自SEQ ID NO: 29-36的一个序列。

核酸和蛋白质向细胞和组织的基于温度的瞬时递送

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年3月20日提交的美国临时申请号62/992,700和2019年12月31日提交的美国临时申请号62/955,801的权益,将这些申请的公开文本通过引用以其全文特此并入。

以ASCII文本文件提交序列列表

[0002] 将以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用以其整体并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称:699442001240SEQLIST.TXT,记录日期:2020年12月27日,大小:25KB)。

技术领域

[0003] 本公开文本涉及用于在一个或多个细胞中瞬时激活温度敏感性药剂(ts药剂)的方法,例如通过使一个或多个细胞与ts药剂接触并在允许温度下瞬时孵育细胞以诱导所述细胞中ts药剂的活性。对于离体治疗策略,将一个或多个细胞在允许温度下用治疗性ts药剂离体处理,随后在非允许温度(例如,受试者的正常核心体温)下将细胞转移到受试者。对于体内治疗策略,将治疗性ts药剂递送至维持在允许温度下的受试者,从而允许所述治疗性ts药剂在有限的时间内在体内起作用,然后当受试者的核心体温恢复正常时或当受试者的表面体温升高(例如,非允许温度)时,永久关闭ts药剂。可替代地,将治疗性ts药剂递送至受试者,随后通过将受试者的核心体温降低至允许温度以诱导受试者的细胞中治疗性ts药剂的活性来瞬时激活ts药剂。

背景技术

[0004] 将治疗性基因产物递送至人体细胞、组织和器官是巨大的挑战。对于需要持续表达基因以补充患者中基因缺陷的传统基因疗法,这已经通过使用病毒载体如逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒实现。然而,同样重要的策略基因疗法涉及基因的瞬时、短期表达。对于这样的应用,不需要基因的持续表达,并且实际上这可能对细胞有害。

[0005] 例如,CAS9是切割DNA的细菌酶。它是基于CRISPR/CAS9的基因编辑复合物的重要组分,其已被考虑用于基因疗法。指导RNA和CAS9均可由单个仙台病毒载体上的基因编码(Park等人,2016)。为了在治疗上使用基因编辑系统,必须将含有CRISPR-CAS9的载体引入人体细胞或人体内。然而,CAS9的持续表达可导致DNA断裂和突变的引入。因此,希望CAS9在短时间内表达,例如,约数小时或数天,而不是一周或更长时间。

[0006] 基因短期表达的另一个应用是用于细胞重编程。最近,已经表明一组转录因子的异位表达可以将细胞转化为治疗上有用的细胞类型。例如,一组三种转录因子可以将胰管细胞转化为分泌胰岛素的胰腺β细胞(Zhou等人,2008)。另一组转录因子可以将成纤维细胞转化为心肌细胞(Ieda等人,2010)。认为将这些转录因子体内递送至人体内可用作一种类型的再生医学。然而,希望使这些有效的改变细胞身份的转录因子仅瞬时表达,因为这些有效转录因子的持续表达可能造成损害。

[0007] 如上述例子所强调的,使用导致基因持续表达的病毒载体的传统基因疗法可能是不希望的。对于基因产物的限时表达,已经开始使用将合成的或体外转录的mRNA递送至细胞中(Warren等人,2010)。然而,这些方法存在若干问题。例如,递送至细胞、组织和器官的mRNA的量是有限的,因此,蛋白质产物的量可能不足以在体内产生具有生物学意义的效果。

[0008] 此外,由于RNA的快速更新(turn-over),其通常仅持续最多12小时(Warren等人,2010;Goparaju等人,2017),必须多次将合成的RNA转染到细胞中。对于人多能干细胞如胚胎干细胞和诱导多能干细胞(iPS)的强制分化,需要在几天的过程内每天转染两次(Akiyama等人,2016;Goparaju等人2017)。为了从人成纤维细胞生成iPS细胞,必须持续超过两周每天转染合成RNA的混合物(Warren等人,2010)。这不仅麻烦,而且效率低。

[0009] 对于iPS细胞的生成,这个问题通过使用自我复制RNA来解决,这使得仅在一次递送后能够长期表达(Yoshioka等人,2013)。自我复制RNA是单链RNA,其通常通过去除编码病毒颗粒形成所需的结构蛋白的DNA而从甲病毒(Jose等人,2009),例如委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、辛德比斯病毒(SINV)和塞姆利基森林病毒(SFV)产生(Petrakova等人,2005)。自我复制RNA编码非结构蛋白(nsP),所述非结构蛋白作为RNA依赖性RNA聚合酶来复制自我复制RNA自身并产生用于翻译的转录物。自我复制RNA也可包括编码目的蛋白的目的基因(GOI)和其他遗传元件。由于其RNA的正反馈产生,自我复制RNA可以以高水平表达GOI。可以将自我复制RNA作为裸RNA(即合成RNA)或作为病毒颗粒递送至哺乳动物细胞,所述病毒颗粒可通过包装辅助细胞补充缺失的病毒结构蛋白而产生。

[0010] 自我复制RNA载体的优点是它们的自我复制特征,这导致GOI表达水平的增强。然而,将RNA/蛋白质递送至哺乳动物细胞的自我复制RNA载体的缺点之一是它们的持续表达。通常,RNA依赖性RNA聚合酶和GOI的正反馈产生会持续,这可导致用裸RNA形式的自我复制RNA转染或用病毒形式的自我复制RNA感染的细胞死亡。

[0011] 因此,基因疗法领域需要瞬时表达编码目的蛋白的GOI的工具,例如治疗剂或外来抗原(例如病原体的抗原)。特别地,期望控制RNA载体和自我复制RNA的转录和翻译。

发明内容

[0012] 基于目的基因(GOI)限时表达的必要性,需要瞬时基因产物递送系统,其中核酸或蛋白质可以在体外或体内被递送至特定细胞或在特定细胞中表达,其中核酸/蛋白质的量足以具有生物学上有意义的效果,并且其中瞬时表达可以在实现生物学上有意义的效果后永久关闭。为了满足这些和其他需要,本公开文本涉及用于在受试者中(体内)或在培养的细胞中(离体)瞬时诱导温度敏感性药剂(ts药剂)如治疗性ts药剂的活性的方法。在一些实施方案中,所述治疗性ts药剂与温和的治疗性低体温组合使用。在其他实施方案中,所述治疗性ts药剂与温和的治疗性高体温或局部加热组合使用。在一些实施方案中,所述ts药剂是ts-RNA分子或ts-蛋白质分子。在一些实施方案中,所述ts药剂由插入温度敏感性病毒载体中的异源核酸或自我复制RNA编码。在一些实施方案中,所述病毒载体选自但不限于仙台病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和 α 病毒载体。在一些实施方案中,所述自我复制RNA包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。在一些实施方案中,所述甲病毒选自但不限于委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。在一些实施方案中,所述目的基因产物不是ZSCAN4。

[0013] 本公开文本的上述和其他目的和特征将从以下参照附图进行的详细描述中变得更清楚。

附图说明

[0014] 图1A-图1D描述了委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 基因组的结构和突变区域的位置。图1A显示野生型VEEV基因组 (TC-83毒株:完整基因组11,446bp线性RNA:NCBI登录号:L01443.1 GI:323714) 的示意图。非结构蛋白 (nsP1、nsP2、nsP3、nsP4) 的基因编码RNA依赖性RNA聚合酶,并且结构蛋白的基因编码病毒包膜蛋白 (C、E1、E2)。5' -UTR (5' -非翻译区) 和 3' -UTR (3' -非翻译区)。以粗体框表示的nsP2蛋白的基因发生突变以产生温度敏感性。图1B显示了具有突变1的nsP2 (温度敏感性突变体1:ts1) 的示意图。在氨基酸439与440之间插入五个氨基酸。图1C显示了具有突变2的nsP2 (ts2) 的示意图。在氨基酸586与587之间插入五个氨基酸。图1D显示了具有突变3的nsP2 (ts3) 的示意图。在氨基酸594与595之间插入五个氨基酸。

[0015] 图2A-图2C描述了VEEV nsP2的部分序列,其对应于ts1、ts2和ts3中突变的区域。图2A显示与突变体1 (ts1) 相比的野生型序列,所述突变体1 (ts1) 包括导致5个氨基酸插入的15个核苷酸插入。图2B显示与突变体2 (ts2) 相比的野生型序列,所述突变体2 (ts2) 包括导致5个氨基酸插入的15个核苷酸插入。图2C显示与突变体3 (ts3) 相比的野生型序列,所述突变体3 (ts3) 包括导致5个氨基酸插入的15个核苷酸插入。

[0016] 图3描述了野生型 (TC-83毒株) 和突变体4 (ts4) 的VEEV nsP1的部分核苷酸序列,其分别如SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示。5' -UTR和51-nt CSE (保守序列元件) 以粗体显示。ts4中的突变核苷酸加下划线。

[0017] 图4A和图4B描述了测试srRNA1ts2和srRNA1ts3在30°C、32°C和37°C下的温度敏感性。生成了野生型 (srRNA1wt-GFP) 和突变体 (srRNA1ts2-GFP、srRNA1ts3-GFP) 自我复制RNA (srRNA) 载体。将体外转录产生的RNA转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在分别维持在30°C、32°C和37°C下的CO₂培养箱中培养细胞。分别在20小时和48小时获得细胞照片。上图显示相对比图像,并且下图显示检测绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达的荧光图像。图4A显示用srRNA1wt-GFP、srRNA1ts2-GFP和srRNA1ts3-GFP RNA转染细胞的结果。图4B显示用编码GFP的合成mRNA (synRNA-GFP) 转染细胞的结果。

[0018] 图5描述了测试srRNA1ts1和srRNA1ts2在32°C下的温度敏感性。生成了野生型 (srRNA1wt-GFP) 和突变体 (srRNA1ts2-GFP和srRNA1ts1-GFP) 自我复制RNA (srRNA) 载体。将体外转录产生的RNA转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在维持在32°C下的CO₂培养箱中培养细胞。在24、48、72、96、120、144、168、192、240、288小时获得细胞照片。对于srRNA1ts1-GFP,仅拍摄24小时和168小时的照片。上图显示相对比图像,并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0019] 图6描述了测试srRNA1ts2和srRNA1ts4在32°C、33°C、37°C下的温度敏感性。生成了突变体 (srRNA1ts2-GFP和srRNA1ts4-GFP) 自我复制RNA (srRNA) 载体。将体外转录产生的RNA转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在分别维持在32°C、33°C、37°C下的CO₂培养箱中培养细胞。在20、48、96小时获得细胞照片。上图显示相对比图像,并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0020] 图7描述了测试维持在32℃下的突变体srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。将通过突变载体体外转录产生的RNA (srRNA1ts2-GFP) 转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在维持在32℃下的CO₂培养箱中培养细胞。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶 (pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素选择转染的细胞。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。在24、48、96、144、168、192小时获得细胞照片。上图显示相对比图像, 并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0021] 图8描述了在24小时采用从32℃到37℃的温度转换测试突变体srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。将通过突变载体体外转录产生的RNA (srRNA1ts2-GFP) 转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在维持在32℃下的CO₂培养箱中培养细胞。在24小时, 将细胞转移到维持在37℃下的CO₂培养箱中。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶 (pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素选择转染的细胞。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。在24、48、96、144、168、192小时获得细胞照片。上图显示相对比图像, 并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0022] 图9描述了在48小时采用从32℃到37℃的温度转换测试突变体srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。将通过突变载体体外转录产生的RNA (srRNA1ts2-GFP) 转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在维持在32℃下的CO₂培养箱中培养细胞。在48小时, 将细胞转移到维持在37℃下的CO₂培养箱中。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶 (pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素选择转染的细胞。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。在24、48、96、144、168、192小时获得细胞照片。上图显示相对比图像, 并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0023] 图10描述了在72小时采用从32℃到37℃的温度转换测试突变体srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。将通过突变载体体外转录产生的RNA (srRNA1ts2-GFP) 转染到人诱导多能干细胞 (ADSC-iPSC品系) 中。在维持在32℃下的CO₂培养箱中培养细胞。在72小时, 将细胞转移到维持在37℃下的CO₂培养箱中。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶 (pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素选择转染的细胞。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。在24、48、96、144、168、192小时获得细胞照片。上图显示相对比图像, 并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。

[0024] 图11A-图11D描述了在成纤维细胞中测试突变体srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。将通过突变载体体外转录产生的RNA (srRNA1ts2-GFP) 转染到人新生真皮成纤维细胞 (HDFn品系) 中。在维持在32℃下的CO₂培养箱中培养细胞。在24、48和96小时获得细胞照片。上图显示相对比图像, 并且下图显示检测GFP的表达的荧光图像。图11A和图11B描述了使用JetMessenger (Polyplus) 进行的转染。在单独的标准培养基 (图11A) 或补充有200ng/ml B18R的标准培养基 (图11B) 中培养细胞。图11C和图11D描述了使用MessengerMax (ThermoFisher) 进行的转染。在单独的标准培养基 (图11C) 或补充有200ng/ml B18R的标准培养基 (图11D) 中培养细胞。

[0025] 图12描述了对应于各种甲病毒家族成员的nsP2突变体2 (ts2) 的氨基酸序列的比对。左图描述了SEQ ID NO:21-28所示的野生型序列的比对 (部分复制自Russo等人, 2006的图1), 而右图描述了SEQ ID NO:29-36所示的突变体序列的比对, 所述突变体序列包括在nsP2的二级结构中的“β5”与“β6” (第5个和第6个“β链”) 之间插入5个氨基酸。VEEV (委内瑞拉

马脑炎病毒)、Aura(奥拉病毒)、WEEV(西部马脑炎病毒)、BFV(巴马森林病毒)、ONNV(奥-奈氏病毒)、RRV(罗斯河病毒)、SFV(塞姆利基森林病毒)、和SINV(辛德比斯病毒)。

[0026] 图13描述了显示用温度敏感性药剂(ts药剂)对细胞进行的典型离体处理的示意图。ts药剂如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。用ts药剂处理的靶细胞在允许温度下培养特定的持续时间(例如,3天),然后在非允许温度下继续培养特定的持续时间(例如,10天)。目的基因(GOI)的RNA(或从RNA翻译的蛋白质)的预期水平在允许温度下增加并达到高水平。在转换至非允许温度后,RNA(或蛋白质)的预期水平随着转录和翻译停止而逐渐降低。

[0027] 图14描述了显示示例性离体治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。靶细胞取自患者的身体(自体移植),并在允许温度下例如在33℃下与ts药剂离体孵育特定的持续时间,例如24小时。然后,将具有ts药剂的靶细胞移植到患者体内。在37℃的非允许温度下,ts药剂在患者体内不起作用。

[0028] 图15描述了显示另一示例性离体治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。靶细胞取自供体的身体(同种异体移植),并在允许温度下例如在33℃下与ts药剂离体孵育特定的持续时间,例如24小时。然后,将具有ts药剂的靶细胞移植到患者体内。在37℃的非允许温度下,ts药剂在患者体内不起作用。

[0029] 图16描述了显示示例性半体内治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。患者经历治疗性低体温的程序,并且患者的核心体温维持在低于正常体温(例如,37℃)的降低的温度(例如,33℃)下。用ts药剂离体处理靶细胞(自体的或同种异体的)并立即输注到患者的循环中或注射到患者的器官中。当患者在降低的温度(例如,33℃)下维持一定时间(例如,24小时)时,ts药剂起作用。随后,患者的核心体温返回到正常温度(37℃),此时ts药剂不再起作用。

[0030] 图17描述了显示示例性体内治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。患者经历治疗性低体温的程序,并且患者的核心体温维持在低于正常体温(例如,37℃)的降低的温度(例如,33℃)下。将ts药剂直接全身递送或递送至特定器官、组织或细胞类型。当患者在降低的温度(例如,33℃)下维持一定时间(例如,24小时)时,ts药剂起作用。随后,患者的核心体温返回到正常温度(37℃),此时ts药剂不再起作用。

[0031] 图18描述了人ES/iPS细胞分化成神经元。显示了典型实验程序的示意图。在第-1天将人ES/iPS细胞铺板在细胞培养皿上。在第0天,用srRNA1ts2-NGN3转染细胞。将细胞在33℃下培养72小时。在第3天,将细胞重新铺板在新的培养皿上,然后将细胞培养物转移到37℃。在第3天,将嘌呤霉素添加至培养基中,持续24小时。在第0天(转染前)、第1天、第2天、第3天(传代前)、第4天(培养基更换前)、第5天和第6天拍摄相对比显微图像。还显示了第6天图片的放大图像。在第9天将细胞固定并将其用于用抗TUBB3(β 3-微管蛋白)(红色信号)免疫染色,所述抗TUBB3对成熟神经元具有特异性(10x和20x物镜)。

[0032] 图19描述了人ES/iPS细胞分化成血管内皮细胞。显示了典型实验程序的示意图。

在第-1天将人ES/iPS细胞铺板在细胞培养皿上。在第0天,用srRNA1ts2-ETV2转染细胞。将细胞在33℃下培养72小时。在第3天,将细胞培养物转移到37℃。在第3天,将嘌呤霉素添加至培养基中,持续48小时。(下图)在第1、2、3、4、5、6、7和8天拍摄相对比显微图像。在第8天将细胞固定并将其用于用抗CD31免疫染色(10x和20x物镜)。

[0033] 图20描述了显示示例性体内治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如31℃-34℃)下起作用,但在非允许温度(例如,>37℃)下不起作用。等于或略低于患者身体表面的温度(体表温度)即约31℃-34℃低于患者核心体温即约37℃。通过皮内、皮下或肌内施用将ts药剂直接递送至患者,其中其在患者的体表体温下起作用。无需采取进一步措施。可替代地,当不再需要ts药剂的功能时,可通过瞬时增加患者体表体温使ts药剂失去功能。

[0034] 图21描述了显示编码严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2,也称为2019-nCoV)的刺突蛋白(或其部分)的示例性srRNA1ts2载体的示意图。SARS-CoV-2是冠状病毒疾病2019(COVID-2019)的病原体。srRNA1ts2载体的非结构蛋白(nsP1-nsP4)是RNA基因组复制和转录所需要的,而目的基因(GOI)编码刺突蛋白或其片段。“srRNA1ts2-2019-nCoV-刺突”编码2019-nCoV的全长刺突蛋白(SEQ ID NO:41)。“srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1”编码融合蛋白(SEQ ID NO:42),其包括2019-nCoV的刺突蛋白的CD5的信号肽(残基1-24)和RBD。“srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2”编码融合蛋白(SEQ ID NO:43),其包括2019-nCoV的刺突蛋白的信号肽、RBD、跨膜结构域和胞质尾。2019-nCoV的RBD的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示。缩写:SP(信号肽);RBD(受体结合结构域);TM(跨膜结构域);和CT(胞质尾)。

[0035] 图22描述了显示示例性体内治疗程序的示意图。温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如31℃-35℃)下起作用,但在非允许温度(例如,>37℃)下不起作用。患者身体的气道的温度(气道温度)(鼻腔和上气管为约32℃,且亚段支气管为约35℃(McFadden等人,1985))低于患者的核心体温即约37℃。通过经鼻施用(例如,吹入、吸入或滴注)将ts药剂直接递送至患者,其中其在患者的气道温度下起作用。无需采取进一步措施。当不再需要ts药剂的功能时,可通过瞬时增加患者的气道温度使ts药剂失去功能。

[0036] 图23描述了作为将编码目的基因(萤光素酶)的RNA皮内施用至远交系小鼠后肢的结果,目的基因在体内的表达。

[0037] 图24A-图24B显示了从通过皮内注射编码SARS-CoV-2的受体结合结构域(RBD)的温度敏感性srRNA1ts2 RNA(srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1)或安慰剂(仅缓冲液)进行免疫的小鼠获得的脾细胞样品中细胞因子分泌细胞的频率。图24A显示来自存在和不存在SARS-CoV-2抗原的情况下培养的免疫小鼠的脾细胞中干扰素- γ (INF- γ)斑点形成细胞(SFC)的频率,并且图24B显示所述脾细胞中白细胞介素-4(IL-4)SFC的频率,如通过ELISpot测定法测定的。黑色条(刺激的)代表通过覆盖SARS-CoV-2RBD的53个肽的池(具有11个氨基酸重叠的15聚体)刺激24小时的脾细胞。灰色条(对照)代表未刺激的脾细胞。显示了一式三份样品的平均值和标准偏差(误差条)。

[0038] 图25A-图25C显示通过皮内注射编码SARS-CoV-2的受体结合结构域(RBD)的温度敏感性srRNA1ts2 RNA(srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1)或安慰剂(仅缓冲液)进行免疫的小鼠的SARS-CoV-2抗原反应性血清免疫球蛋白G(IgG)的水平。简言之,在第0天和第14天,小鼠

接受安慰剂,或在存在和不存在RNA酶抑制剂的情况下接受srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 (黑色三角形)。在第49天,所有小鼠接受重组RBD蛋白(空心三角形)。星号(*)表示IgG水平高于3 (OD450)。图25A显示接受两剂安慰剂(仅缓冲液)的小鼠的结果。图25B显示接受两剂srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA的小鼠的结果。图25C显示接受两剂srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA与RNA酶抑制剂的组合的小鼠的结果。星号(*)表示IgG水平高于3 (OD450)。所有组中n=10。

具体实施方式

综述

[0039] 申请人已经证明可以在允许温度下培养细胞以诱导温度敏感性治疗剂的活性,并且所述活性可以在细胞中产生治疗效果。此外,温度敏感性治疗剂的活性可以通过随后在非允许温度下孵育细胞来降低或抑制。申请人还首次提供了在体内使用温度敏感性药剂(ts药剂)的方法。体外使用的相同类型的ts药剂可以在体内使用。例如,在将ts药剂施用至受试者的核心后,可将受试者的核心体温降低到允许温度以诱导ts药剂的活性。可替代地,在将ts药剂施用至受试者的表面(表皮、真皮、皮下组织或骨骼肌)后,将受试者的表面体温维持在允许温度以诱导ts药剂的活性。受试者的表面体温可以自然或人为地维持。这些方法提供了递送和瞬时激活治疗剂如核酸和多肽的新方法。特别地,本公开文本提供了用于将核酸和蛋白质温度敏感地递送至细胞的工具,条件是所述核酸和蛋白质不是ZSCAN4核酸和蛋白质。

[0040] 因此,本公开文本一般涉及在体外瞬时诱导温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的活性的方法。在一些实施方案中,将一个或多个包含温度敏感性治疗剂的细胞在允许温度下培养以诱导温度敏感性治疗剂的活性。将细胞在允许温度下培养一定的时间段,所述时间段足以使温度敏感性治疗剂在细胞中诱导治疗效果。然后将细胞返回非允许温度,其中所述非允许温度降低或抑制温度敏感性治疗剂的活性。在另一个实施方案中,所述一个或多个细胞尚未包含温度敏感性治疗剂,并且首先与温度敏感性治疗剂接触。在一些实施方案中,在所述一个或多个细胞中诱导治疗效果后,将所述细胞施用至有需要的受试者。在一些实施方案中,从需要治疗的受试者中分离所述一个或多个细胞,并且在用温度敏感性治疗剂处理后,将细胞返回至所述受试者。

[0041] 在另一方面,本公开文本涉及在体内瞬时诱导温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的活性的方法。在一些实施方案中,受试者中的一个或多个细胞包含温度敏感性治疗剂,并且将受试者的体温降低至允许温度,持续一定的时间段,所述时间段足以使温度敏感性治疗剂在细胞中诱导治疗效果,然后使受试者的体温返回到正常体温。在另一个实施方案中,将温度敏感性治疗剂在受试者体温降低至允许温度之前或之后施用至受试者。

[0042] 本公开文本的其他方面涉及通过动员患有疾病或病症的受试者中的骨髓细胞治疗疾病或病症,所述方法包括:从受试者分离动员的骨髓细胞,在约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的温度下培养分离的骨髓细胞,使所述细胞与温度敏感性病毒载体(例如仙台病毒载体)或温度敏感性自我复制RNA(srRNA)接触,其中所述病毒载体或srRNA包含异源核酸分子,将接触的细胞在约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下维持足够的时间段,其中所述病毒载体或srRNA能够在 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下复制,所述病毒载体或srRNA的复制导致异源核酸分子的表达增加,以及将接触的细胞植入

到受试者中以治疗所述疾病或病症。可替代地,在从受试者分离动员的骨髓细胞后,使分离的骨髓细胞与温度敏感性病毒载体(例如仙台病毒载体)或温度敏感性srRNA接触,然后在约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的温度下培养细胞。

[0043] 在另一方面,本公开文本涉及通过向有需要的受试者施用温度敏感性病毒载体(例如仙台病毒载体)或温度敏感性自我复制RNA(srRNA)治疗疾病或病症,其中所述病毒载体或srRNA包含异源核酸,将受试者的核心体温降低至约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,将受试者的核心体温在约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下维持足够的时间段,其中所述病毒载体或srRNA能够在 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下复制,并且病毒载体或srRNA的复制导致异源核酸分子的表达增加,以及使受试者的核心体温返回到正常。可替代地,在施用温度敏感性病毒载体(例如仙台病毒载体)或温度敏感性srRNA之前,将受试者的核心体温降低至约 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0044] 关于通过向受试者施用ts药剂或包含ts药剂的细胞来治疗疾病或病症的方法的参考和权利要求,其一般和特定形式同样涉及:

- a) ts药剂或包含ts药剂的细胞在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途;和
- b) 用于治疗疾病或病症的包含ts药剂或含有ts药剂的细胞的药物组合物。

[0045] 在前述段落的方法的一些实施方案中,异源核酸包含目的基因(GOI)或编码目的蛋白。在优选的实施方案中,目的蛋白是治疗剂。在一些实施方案中,GOI是GOI的显性负性形式,或编码人工蛋白质(例如,通过融合不同蛋白质结构域制成的杂合蛋白质)的人工基因。在一些实施方案中,异源核酸包括非编码RNA、siRNA或shRNA。在其他实施方案中,异源核酸包含核酸内切酶编辑系统。在一些实施方案中,核酸内切酶编辑系统选自但不限于ZFN系统、TALEN系统和CRISPR/CAS9系统。在一些实施方案中,目的蛋白选自但不限于人神经元素3(NGN3)、人ETS易位变体2(ETV2)、脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)。在一些实施方案中,目的蛋白是促红细胞生成素(EPO)或粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。在其他实施方案中,目的蛋白是酶,例如腺苷脱氨酶(ADA),用于酶替代疗法。在一些实施方案中,目的蛋白是由病原生物如病毒、原生动物或细菌编码的抗原,用于针对传染病的疫苗接种。

定义

[0046] 如本文和所附权利要求中所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”包括复数形式,除非另有指示。例如,“一个多核苷酸”包括一个或多个多核苷酸。

[0047] 如本文所用短语“包含”是开放性的,表明此类实施方案可以包括另外的要素。相反,短语“由……组成”是封闭的,表明这些实施方案不包括另外的要素(痕量杂质除外)。短语“基本上由……组成”是部分封闭的,表明这些实施方案可以进一步包括不在实质上改变这些实施方案的基本特征的要素。应理解,本文描述为“包含”的方面和实施方案包括“由……组成”和“基本上由……组成”实施方案。

[0048] 如本文所用,关于除温度外的值的术语“约”包括该值的90%至110%(例如,约30分钟是指27分钟至33分钟),除非另有说明。当用于摄氏温度时,约包括该值的 -1°C 至 $+1^{\circ}\text{C}$ (例如,约 37°C 是指 36°C 至 38°C),除非另有说明。相比之下,仅仅使用加或减表示指定的范围(例如, $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 是指 32.5°C 至 33.5°C)。

[0049] 如本文所用,数字范围包括定义范围的数字(例如,12-18个核苷酸包括12、13、14、15、16、17和18个核苷酸)。

[0050] 如本文所用,术语“分离的”和“纯化的”是指从其环境(例如,细胞培养物、生物样品等)中移出(例如,分离)的对象(例如,细胞)。“分离的”对象至少50%不含,优选地75%不含,更优选地至少90%不含,最优选地至少95%(例如,95%、96%、97%、98%或99%)不含与它们缔合的其他组分。

[0051] 术语“个体”和“受试者”是指哺乳动物。“哺乳动物”包括但不限于人、非人灵长类动物(例如,猴子)、农场动物、运动动物、啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)和宠物(例如,狗和猫)。

[0052] 如本文所用,关于药物组合物的术语“剂量”是指在任一时间由受试者服用(施用或接受)的组合物的测量部分。

[0053] 术语“治疗”疾病或病症是指执行方案,所述方案可包括向个体(人或其他哺乳动物)施用一种或多种药物组合物,以努力减轻疾病的体征或症状。因此,“治疗”(“treating”或“treatment”)不需要完全减轻体征或症状,不需要治愈,并且特别包括对个体仅具有缓和作用的方案。如本文所用,并且如本领域所熟知的,“治疗”是用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。有益或所需的临床结果包括但不限于减轻或改善一种或多种症状、降低疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、预防疾病传播、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态以及缓解(部分或全部)。

[0054] “刺激”免疫应答意指增加免疫应答,其可以通过引发新的免疫应答(例如,作为初始接种方案的结果)或增强现有的免疫应答(例如,作为加强接种方案的结果)而产生。在一些实施方案中,刺激免疫应答包括但不限于由以下组成的组中的一种或多种:刺激CD4+T辅助细胞增殖;刺激细胞因子产生;刺激B淋巴细胞增殖;刺激抗体产生;刺激CD8+细胞毒性T细胞增殖;以及刺激受感染细胞的细胞溶解。在一些优选的实施方案中,刺激免疫应答包括增加受试者中的抗原特异性抗体应答。优选地,增加抗原特异性抗体应答包括使抗原特异性抗体的浓度比施用前水平增加至少2、3或4倍。在一些实施方案中,增加抗原特异性抗体应答包括增加抗原特异性抗体浓度,使其高于最低水平,优选高于血清保护水平。

温度敏感性药剂

[0055] 本公开文本的某些方面涉及在一个或多个细胞中瞬态诱导温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的活性。温度敏感性药剂的活性是指所述药剂的任何所需的激活、复制或增加的表达。如文中所用,术语“温度敏感性药剂”是指在不同温度下具有不同功能水平的任何核酸或多肽。示例性温度敏感性药剂包括但不限于温度敏感性病毒载体、温度敏感性自我复制RNA和温度敏感性多肽。

[0056] 如文中所用,术语“允许温度”是指本公开文本的温度敏感性药剂的活性被诱导的任何温度。通常,允许温度不是受试者的正常体温。人受试者的正常体温为约 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。取决于温度敏感性药剂,允许温度可以是高于或低于受试者的正常体温的温度。在一些方面,温度敏感性药剂的允许温度范围为 30°C 至 36°C 。在一些实施方案中,允许温度为约 31°C 至约 35°C 、或 32°C 至 34°C ($33^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$)。在一些优选实施方案中,允许温度为 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。由此可见,在一些实施方案中,本公开文本的温度敏感性自我复制RNA的非允许温度高于 36°C 。在一些优选实施方案中,非允许温度为 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0057] 在一些实施方案中,在允许温度下诱导的温度敏感性药剂的活性在非允许温度下被降低或抑制。如文中所用,术语“非允许温度”是指本公开文本的温度敏感性药剂的活性

不被诱导的任何温度。当温度敏感性药剂的活性比最佳允许温度下的活性水平低至少95%、低至少90%、低至少85%、低至少80%、低至少75%或低至少50%时，温度敏感性药剂未被诱导。通常，非允许温度是受试者的正常体温。取决于温度敏感性药剂，非允许温度也可能是高于或低于受试者正常体温的温度。

温度敏感性病毒载体

[0058] 在某些实施方案中，本公开文本的温度敏感性治疗剂可以包括温度敏感性病毒载体。在一些实施方案中，在允许温度下诱导的温度敏感性病毒载体的活性可以包括载体的复制。如文中所用，术语“温度敏感性病毒载体”是指在不同温度下具有不同功能水平的任何病毒载体。示例性温度敏感性病毒载体包括但不限于仙台病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体或甲病毒载体。示例性温度敏感性甲病毒载体包括但不限于委内瑞拉马脑炎病毒载体、辛德毕斯病毒载体和塞姆利基福雷斯病毒载体。

[0059] 在本公开文本的一些实施方案中，温度敏感性病毒载体包括异源核酸（例如，与病毒载体相关的外来核酸）。核酸可包括遗传元件。如文中所用，术语“遗传元件”是指任何编码RNA或目的多肽的核酸。示例性遗传元件包括但不限于目的基因（GOI）、目的基因的显性负性形式、编码人工蛋白（例如通过融合不同蛋白质结构域制成的杂合蛋白质）的人工基因、非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。在一些实施方案中，核酸内切酶编辑系统选自ZFN系统、TALEN系统和CRISPR/CAS9系统。在一些实施方案中，GOI编码选自但不限于人神经元素3（NGN3）、人ETS易位变体2（ETV2）、脑源性神经营养因子（BDNF）和神经生长因子（NGF）的蛋白质。在一些实施方案中，目的蛋白是促红细胞生成素（EPO）或粒细胞集落刺激因子（G-CSF）。在其他实施方案中，目的蛋白是酶，例如腺苷脱氨酶（ADA），用于酶替代疗法。在一些实施方案中，目的蛋白是由病原生物如病毒、原生动物或细菌编码的抗原，用于针对传染病的疫苗接种。

[0060] 本公开文本的温度敏感性病毒载体的允许温度通常在30℃至36℃或38℃至50℃的范围内。在一些实施方案中，允许温度为约31℃至约35℃、或32℃至34℃（33℃±1.0℃）。在一些优选实施方案中，允许温度为33℃±0.5℃。由此可见，在一些实施方案中，本公开文本的温度敏感性病毒载体的非允许温度高于36℃且低于38℃。在一些优选实施方案中，非允许温度为37℃±0.5℃。

[0061] 如本文所公开的，可将细胞在允许温度下维持一定的时间段，所述时间段足以使温度敏感性药剂诱导效果。在一些实施方案中，温度敏感性病毒载体包括遗传元件，并且效果包括遗传元件的表达增加，其中遗传元件的表达导致产生在细胞中产生生物效果的RNA或多肽。在一些优选的实施方案中，效果是治疗效果。

温度敏感性自我复制RNA

[0062] 在某些实施方案中，本公开文本的温度敏感性治疗剂可以包括温度敏感性自我复制RNA。如文中所用，术语“温度敏感性自我复制RNA”是指在不同温度下具有不同功能水平的任何自我复制RNA。

[0063] 在一些实施方案中，温度敏感性自我复制RNA通过工程化自我复制RNA产生，所述自我复制RNA是通常通过去除编码病毒颗粒形成所需的结构蛋白的DNA由甲病毒如委内瑞拉马脑炎病毒（VEEV）、辛德比斯病毒（SINV）和塞姆利基森林病毒（SFV）制成的单链RNA（Petrakova等人，2005）。在一些实施方案中，自我复制RNA编码非结构蛋白（nsP），所述非结

构蛋白作为RNA依赖性RNA聚合酶来复制自我复制RNA本身,并产生用于翻译的转录物。在一些实施方案中,自我复制RNA还可以包括编码目的蛋白的目的基因(GOI)和其他遗传元件。在一些实施方案中,不希望受到理论的约束,由于其RNA的正反馈产生,因此自我复制RNA可以以高水平表达GOI。在一些实施方案中,温度敏感性自我复制RNA可以通过突变编码nsP的基因来产生。

[0064] 在一些实施方案中,温度敏感性自我复制RNA可以作为裸RNA(即合成RNA)递送至哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,温度敏感性自我复制RNA可以作为纳米颗粒包封的裸RNA(即合成RNA)递送至哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,纳米颗粒被工程化以靶向特定的细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。在一些实施方案中,温度敏感性自我复制RNA可以作为病毒颗粒递送至哺乳动物细胞,所述病毒颗粒可以通过包装辅助细胞来补充缺失的病毒结构蛋白而生成。在一些实施方案中,病毒颗粒被工程化以靶向特定的细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。

[0065] 当温度敏感性药剂是温度敏感性自我复制RNA时,在允许温度下诱导的温度敏感性自我复制RNA的活性可包括RNA的复制。

[0066] 在一些方面,本公开文本的温度敏感性自我复制RNA的允许温度通常在30℃至36℃的范围内。在一些实施方案中,允许温度为约31℃至约35℃、或32℃至34℃(33℃±1.0℃)。在一些优选实施方案中,允许温度为33℃±0.5℃。由此可见,在一些实施方案中,本公开文本的温度敏感性自我复制RNA的非允许温度高于36℃。在一些优选实施方案中,非允许温度为37℃±0.5℃。

[0067] 在其他方面,本公开文本的温度敏感性自我复制RNA的允许温度通常在38℃至50℃的范围内。由此可见,在一些实施方案中,本公开文本的温度敏感性自我复制RNA的非允许温度高于36℃且低于38℃。在一些优选实施方案中,非允许温度为37℃±0.5℃。

温度敏感多肽

[0068] 在某些实施方案中,本公开文本的温度敏感性治疗剂可以包括温度敏感性多肽。如文中所用,术语“温度敏感性多肽”是指在不同温度下具有不同功能水平的任何温度敏感性多肽。在一些实施方案中,温度敏感性多肽可以是温度敏感性抗体。在其他实施方案中,温度敏感性多肽选自但不限于转录因子、生长因子、细胞表面标记物、细胞融合蛋白、表观遗传修饰物、酶和结构蛋白。

[0069] 当温度敏感性药剂是温度敏感性多肽时,在允许温度下诱导的温度敏感性蛋白质的活性可包括蛋白质的构象变化(例如,结构或形状的变化)。

[0070] 本公开文本的温度敏感性多肽的允许温度通常在30℃至36℃或38℃至50℃的范围内。在一些实施方案中,允许温度为约31℃至约35℃、或32℃至34℃(33℃±1.0℃)。在一些优选实施方案中,允许温度为33℃±0.5℃。由此可见,在一些实施方案中,本公开文本的温度敏感性自我复制多肽的非允许温度高于36℃且低于38℃。在一些优选实施方案中,非允许温度为37℃±0.5℃。

[0071] 本公开文本的各个方面涉及基本上纯化的多肽。基本上纯化的多肽可以指基本上不含与其天然缔合的其他多肽、脂质、碳水化合物或其他物质的多肽。在一个实施方案中,多肽至少50%,例如至少80%不含与其天然缔合的其他多肽、脂质、碳水化合物或其他物质。在另一个实施方案中,多肽至少90%不含与其天然缔合的其他多肽、脂质、碳水化合物

或其他物质。在又一个实施方案中,多肽至少95%不含与其天然缔合的其他多肽、脂质、碳水化合物或其他物质。

核酸和多肽

[0072] 本公开文本的某些方面涉及在一个或多个细胞中瞬时诱导温度敏感性治疗剂的活性,其中所述活性导致核酸分子的表达增加。在一些实施方案中,核酸是多核苷酸。多核苷酸可以指任何长度的核酸序列(例如线性序列)。因此,多核苷酸包括寡核苷酸,以及在染色体中发现的基因序列。寡核苷酸是通过天然磷酸二酯键连接的多个连接核苷酸。寡核苷酸是长度为6至300个核苷酸的多核苷酸。寡核苷酸类似物是指功能类似于寡核苷酸但具有非天然存在部分的部分。例如,寡核苷酸类似物可以含有非天然存在的部分,例如改变的糖部分或糖间连接,例如硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸。天然存在的多核苷酸的功能类似物可以结合RNA或DNA,并且包括肽核酸(PNA)分子。

[0073] 在某些实施方案中,核酸分子或多核苷酸编码遗传元件。这些多核苷酸包括编码目的基因的DNA、cDNA和RNA序列,如mRNA序列。编码序列可以与异源启动子可操作地连接以指导遗传元件的转录。启动子可以是指指导核酸的转录的核酸控制序列。启动子包括靠近转录起始位点的必需核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件。组成型启动子是具有连续活性并且不受外部信号或分子调节的启动子。相反,诱导型启动子的活性受外部信号或分子(例如转录因子)调节。在第一核酸序列被置于与第二核酸序列具有功能性关系的位置中时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子与该编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的核酸序列是连续的,且在必要时将两个蛋白质编码区结合在同一阅读框内。异源多肽或多核苷酸是指源自不同来源或物种的多肽或多核苷酸。启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,例如在聚合酶II型启动子的情况下,TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件,其可以位于距转录起始位点多达数千个碱基对处。在一个例子中,启动子是组成型启动子,例如CAG启动子(Niwa等人, Gene 108 (2) :193-9, 1991),或磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子,例如四环素诱导型启动子(Masui等人, Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005)。可用于驱动遗传元件表达的其他示例性启动子包括但不限于: lac系统、trp系统、tac系统、trc系统、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区域、fd外壳蛋白的控制区、SV40的早期和晚期启动子、源自多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒、杆状病毒和猿猴病毒的启动子、3-磷酸甘油酸激酶的启动子、酵母酸性磷酸酶的启动子和酵母 α 交配因子的启动子。本公开文本的遗传元件可以处于以下启动子的控制下:组成型启动子、诱导型启动子、或本文所述的任何其他合适的启动子、或本领域技术人员将易于识别的其他合适的启动子。

[0074] 在一些实施方案中,诱导温度敏感性药剂的活性导致核酸或多肽的表达增加,其可包括例如,相对于未与药剂接触的人细胞中的多核苷酸或多肽表达,表达增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少200倍、至少300倍、至少400倍、至少500倍、至少600倍、至少700倍、至

少800倍、至少900倍、至少1,000倍、至少2,000倍、至少3,000倍、至少4,000倍、至少5,000倍、至少6,000倍、至少7,000倍、至少8,000倍、至少9,000倍、至少10,000倍、至少25,000倍、至少50,000倍、至少75,000倍、至少100,000倍、至少125,000倍、至少150,000倍、至少175,000倍、至少200,000倍、至少225,000倍、至少250,000倍、至少275,000倍、至少300,000倍、至少325,000倍、至少350,000倍、至少375,000倍、至少400,000倍、至少425,000倍、至少450,000倍、至少475,000倍、至少500,000倍、至少750,000倍或至少1,000,000倍。

[0075] 本公开文本的各个方面涉及分离的实体,例如分离的核酸或合成的mRNA分子。分离的核酸已经基本上从其他核酸序列和其中核酸天然存在的生物体的细胞,即其他染色体和染色体外DNA和RNA中分离或纯化。因此,术语“分离的”包括通过标准核酸纯化方法纯化的核酸。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸以及化学合成的核酸。类似地,分离的多肽已经基本上从蛋白质天然存在的生物体的细胞的其他多肽中分离或纯化,并且包括通过在宿主细胞中重组表达而制备的多肽以及化学合成的多肽。类似地,分离的细胞基本上与其他细胞类型分离。

将温度敏感性药剂引入细胞的方法

[0076] 在一些实施方案中,将一个或多个细胞与温度敏感性药剂接触。接触可以指以直接物理缔合的方式放置,包括固体和液体形式。“接触”可与“暴露”互换使用。在一些情况下,“接触”包括转染,例如将核酸分子转染到细胞中。在一些情况下,“接触”包括将温度敏感性药剂引入一个或多个细胞中。

[0077] 在一些实施方案中,温度敏感性药剂是多核苷酸(例如自我复制RNA),并且将多核苷酸引入细胞中。将核酸分子或蛋白质引入细胞中包括将核酸分子或蛋白质递送至细胞中的任何方式。例如,可以将核酸分子转染、转导或电穿孔到细胞中。在一些实施方案中,温度敏感性药剂是多肽(例如,温度敏感性多肽),并且将多肽引入细胞中。将多肽递送至细胞中可以例如通过将蛋白质融合至细胞穿透肽,例如具有蛋白质转导结构域(例如,HIV-1Tat)或聚精氨酸肽标签(Fuchs和Raines,Protein Science 14:1538-1544,2005)的肽来实现。蛋白质转导结构域可以指促进较大分子(蛋白质、核酸分子等)通过独立于经典胞吞作用的机制进入细胞的小阳离子肽。聚精氨酸肽标签可以指由精氨酸残基组成的短肽(通常7至11个残基),其促进将较大分子(例如蛋白质和核酸分子)递送至细胞中(参见例如,Fuchs和Raines,Protein Science 14:1538-1544,2005)。

[0078] 用温度敏感性药剂将核酸引入细胞可涉及使用温度敏感性病毒载体(例如整合或非整合病毒载体)或温度敏感性质粒载体。这些方法中的每一种已在本领域中描述,因此在本领域技术人员的能力范围内。本文提供了可用于将核酸引入人细胞的每种方法的简要概述。载体可以指引入宿主细胞从而产生转化的宿主细胞的核酸分子。载体可包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点(参与起始DNA合成的DNA序列)。例如,表达载体含有必需的调控序列以允许插入的一个或多个基因的转录和翻译。载体还可以包括一个或多个选择性标记基因以及本领域中已知的其他遗传元件。载体可包括例如病毒载体和质粒载体。

允许温度

在允许温度下孵育一个或多个细胞

[0079] 本公开文本的某些方面涉及通过在允许温度下孵育细胞以诱导温度敏感性药剂

的活性而在一个或多个细胞中瞬时诱导温度敏感性药剂的活性。在一些实施方案中,允许温度可以高于或低于标准细胞培养温度。例如,人和啮齿动物细胞通常在约37℃的温度下培养。因此,在一些实施方案中,允许温度可以低于约36.5℃。例如,在一些实施方案中,细胞在36℃、35.5℃、35℃、34.5℃、34℃、33.5℃、33℃、32.5℃、32℃、31.5℃、31℃、30.5℃或30℃的允许温度下培养。在一些优选实施方案中,允许温度为30℃至36℃、或31℃至35℃、或32℃至34℃、或32.5℃至33.5℃。在一些实施方案中,允许温度高于或等于(下限)30℃、31℃、32℃、33℃、34℃或35℃,并且低于或等于(上限)36℃、35℃、34℃、33℃、32℃或31℃。

[0080] 在其他实施方案中,允许温度可以高于约37.5℃。例如,在一些实施方案中,细胞在38℃、38.5℃、39℃、39.5℃、40℃、40.5℃、41℃、41.5℃、42℃、42.5℃、43℃、43.5℃、44℃、44.5℃、45℃、45.5℃、46℃、46.5℃、47℃、47.5℃、48℃、48.5℃、49℃、49.5℃或50℃的允许温度下培养。

[0081] 在一些实施方案中,在允许温度下孵育后,将一个或多个细胞在非允许温度下培养,其中温度敏感性药剂的活性被降低或抑制。例如,可以抑制温度敏感性病毒载体的复制,可以抑制温度敏感性自我复制RNA的复制,并且可以抑制温度敏感性多肽的构象变化。这种温度变化使得温度敏感性药剂的活性被瞬时诱导然后被抑制。在其他实施方案中,在允许温度下培养后,将一个或多个细胞施用至受试者。一个或多个细胞可以从允许温度下的培养物直接施用至受试者,或者可以首先在培养物中从允许温度转移到非允许温度,然后施用至受试者。在某些实施方案中,温度敏感性药剂随后被降解。例如,非整合的温度敏感性病毒载体、RNA和多肽将被降解。

将受试者的核心体温降低到允许温度

[0082] 本公开文本的某些方面涉及通过将受试者的核心体温降低至允许温度用于诱导温度敏感性药剂的活性来瞬时诱导受试者的细胞中的温度敏感性治疗剂的活性。在一些实施方案中,使用目标温度管理(TTM)程序来降低受试者的核心体温。TTM程序被设计为实现并维持受试者体内的特定体温一段时间。此类程序先前已在治疗上用于减少各种急性健康问题(例如心脏病发作和中风)引起的负面影响。使用它们的设备和一般方法是本领域已知的并且可以用于本文所述的方法中。该程序可以使用多种方法进行,包括冷却导管、冷却毯和在身体周围施加冰块。

[0083] 在将受试者的核心体温降低至允许温度后,将受试者的核心体温在允许温度下维持足以诱导温度敏感性药剂活性的一段时间。受试者的核心体温随后返回到正常核心体温,这是非允许温度,其中温度敏感性药剂的活性被降低或抑制。在某些实施方案中,温度敏感性药剂随后被降解。例如,非整合的温度敏感性病毒载体、RNA和多肽将在非允许温度下被降解。如本文所用,术语“体温”是指“核心体温”,除非上下文另外明确指出。

将受试者的表面体温维持在允许温度下

[0084] 本公开文本的某些方面涉及利用受试者身体区域中的自然温差。例如,在人受试者身体的表面处或附近的温度(表面体温)为约31-34℃,这低于人受试者的核心体温,即约37℃。如本文所用,受试者身体的“表面”是指表皮、真皮、皮下组织或肌肉中的一种或多种。受试者身体的“皮肤”是指表皮和真皮中的一者或两者。因此,向受试者身体的表皮、真皮或皮下组织施用的合适途径包括皮内和皮下施用。向受试者身体表面附近肌肉施用的合适途径是肌内施用。

[0085] 例如,将ts药剂直接递送至受试者皮肤的特定区域(在疫苗接种的情况下)或递送至受试者皮肤的更宽区域(在皮肤病治疗的情况下)。皮肤温度(约31-34℃)是ts药剂的允许温度,其允许ts药剂起作用。GOI的长期表达不需要进一步的动作。如果需要或期望终止ts药剂的功能,则通过局部加热(例如,热贴片或加热毯)或通过温和的治疗性高体温(例如,温浴或热桑拿)来增加所治疗皮肤的温度并暂时维持在非允许温度(>37℃)。该治疗程序是安全的,因为ts药剂仅在身体的预期区域起作用,因为核心体温是非许可温度(约37℃)。在一些实施方案中,如果受试者的表面体温高于正常值,则降低表面体温以匹配ts药剂的允许温度。

将受试者的上呼吸道温度维持在允许温度

[0086] 类似于人受试者的表面体温,人受试者的上呼吸道和上气管的温度是ts药剂的允许温度,允许ts药剂起作用。即,人受试者的鼻腔和上气管的温度为约32℃,并且人受试者的亚段支气管的温度为约35℃(McFadden等人,1985)。因此,鼻内施用至人患者的上呼吸道(鼻腔、咽部和/或喉部)和/或上气管的细胞的ts药剂在不降低人患者的核心体温的情况下起作用。鼻内施用可以通过吹入、吸入或滴注进行。

非允许温度

在非允许温度下孵育一个或多个细胞

[0087] 细胞的体外培养通常在细胞来源的受试者的正常体温下进行。例如,哺乳动物细胞如人细胞和小鼠细胞通常在约37℃下培养。本公开文本的某些方面涉及在受试者的正常体温下不起作用(例如,不复制或表达基因)的温度敏感性药剂。因此,受试者的正常体温是温度敏感性药剂的非允许温度。在一些优选实施方案中,非允许温度为37℃±0.5℃。

受试者的正常核心体温

[0088] 在一些实施方案中,将温度敏感性药剂、与温度敏感性药剂接触的细胞或携带温度敏感性药剂的细胞引入维持在正常体温的受试者体内。本公开文本的某些方面涉及在生物体的该正常体温(非允许温度)下不起作用,例如复制或表达基因的温度敏感性药剂。该特征提供了在受试者的生命过程中防止温度敏感性药剂的不期望的作用或再激活的安全机制。

人细胞

[0089] 本公开文本的某些方面涉及在一个或多个人细胞(包括但不限于人成体细胞)中瞬时诱导温度敏感性治疗剂的活性。在某些实施方案中,一个或多个人细胞在需要用治疗剂治疗的受试者中。

[0090] 各种人细胞可用于本文所述的方法中。如本文所公开的,术语“人细胞”是指例如干细胞、多能细胞、分化细胞、成熟细胞、体细胞和成体细胞。在一些实施方案中,本公开文本的人细胞是人成体细胞。如本文所公开的,术语“人成体细胞”是指胚胎发育后在整个人体中发现的任何细胞(即,非胚胎细胞)。本公开文本的人细胞包括但不限于精细胞、卵母细胞、受精卵母细胞(即受精卵)、胚胎细胞、成熟细胞、分化细胞、体细胞、祖细胞、胚胎干(ES)细胞、诱导多能干(iPS)细胞、成体干细胞、体干细胞和组织干细胞。成体干细胞,也称为体干细胞或组织干细胞,可以指胚胎发育后全身发现的未分化细胞,所述未分化细胞通过细胞分裂增殖以补充死亡细胞并再生受损组织。祖细胞可以指分化成特定类型的细胞或细胞谱系的寡能或单能细胞。祖细胞类似于干细胞,但分化程度更高并表现出有限的自我更新。

示例性成体干细胞、组织干细胞和/或祖细胞可包括但不限于造血干细胞、间充质干细胞、脂肪干细胞、神经元干细胞、肠干细胞、皮肤干细胞和生殖细胞(例如精细胞和卵母细胞)。

[0091] 人细胞还可包括但不限于体细胞、成熟细胞和分化细胞。体细胞可以指身体的任何细胞,包括但不限于生殖细胞、组织干细胞、祖细胞、诱导多能干(iPS)细胞和分化细胞。示例性体细胞、成熟细胞和/或分化的细胞可包括但不限于表皮细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、肝细胞、上皮细胞、肌细胞、软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、胰腺β细胞、角质细胞、红细胞、外周血细胞、骨髓细胞、神经细胞、星形细胞和生殖细胞。生殖细胞可以指产生有性繁殖的生物体的配子(即卵子和精子)的细胞。在某些实施方案中,生殖细胞包括但不限于卵母细胞和精细胞。在一些实施方案中,本公开文本的体细胞、成熟细胞和/或分化细胞还包括但不限于植入前胚胎。

[0092] 人细胞还可以包括但不限于源自脐带血的细胞、造血干细胞、CD34+细胞、间充质干细胞、血管内皮干细胞、组织干细胞、粒细胞、淋巴细胞、T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、红细胞、网织红细胞和巨核细胞。人细胞还可以包括但不限于人来源的异常细胞,例如癌细胞、肿瘤细胞、恶性细胞、良性细胞、增生细胞、发育不全细胞和非典型细胞。人细胞还可包括但不限于二倍体细胞、单倍体细胞、四倍体细胞、多倍体细胞、核型异常的细胞、染色体异常的细胞、基因突变的细胞、端粒长度异常的细胞、端粒短的细胞和端粒长的细胞。人细胞还可以包括但不限于具有表观遗传异常的细胞,例如具有低甲基化基因组区域的细胞、具有高甲基化基因组区域的细胞、具有异常组蛋白修饰如乙酰化和甲基化的细胞。

[0093] 在一些实施方案中,本公开文本的受试者是非人动物。非人动物可以指除人以外的所有动物。非人动物包括但不限于非人灵长类动物、农场动物如猪、牛和家禽、运动动物或宠物如狗、猫、马、仓鼠、啮齿动物如小鼠、或动物园动物如狮子、老虎或熊。在一个实施方案中,非人动物是小鼠。

温度敏感性药剂的治疗用途

[0094] 本公开文本的温度敏感性药剂可以通过本领域已知的任何合适的方法施用,包括但不限于通过口服施用、舌下施用、经颊施用、局部施用、直肠施用、经由吸入、透皮施用、皮下注射、静脉内(IV)注射、动脉内注射、肌肉注射、心内注射、骨内注射、皮内注射、腹膜内注射、经粘膜施用、阴道施用、玻璃体内施用、关节内施用、关节周围施用、局部施用、表皮施用或其任何组合。在一些实施方案中,组合物通过皮下注射和/或静脉内注射施用。在一些实施方案中,组合物通过注射施用至受试者的脾脏中。

[0095] 在一些方面,本公开文本的方法涉及使用治疗有效量的温度敏感性药剂。药剂的治疗有效量可以指足以实现预期目的的治疗剂的量。例如,在人细胞中治疗疾病或病症的温度敏感性药剂的治疗有效量是足以减轻疾病或病症或疾病或病症的一种或多种症状的量。在一些例子中,治疗有效量可以不100%治疗疾病或病症或疾病或病症的症状。然而,疾病或病症的任何已知特征或症状的减少,例如减少至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%可以是治疗性的。

[0096] 给定治疗剂的治疗有效量将随诸如药剂的性质、施用途径、接受治疗剂的受试者的体型和/或年龄以及施用目的等因素而变化。在每种个体情况下的治疗有效量可以由熟练技术人员根据本领域确定的方法凭经验确定而无需过度实验。

[0097] 受试者可以指活的多细胞脊椎动物生物体,包括人和非人哺乳动物的类别。在一些实施方案中,受试者是人。可以使用本文提供的方法治疗的受试者可以包括哺乳动物受试者,例如兽医或人受试者。受试者可包括受精卵、合子、植入前胚胎、胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童和/或成人。在一些实施方案中,选择待治疗的受试者,例如选择将受益于疗法,特别是包括施用本公开文本的温度敏感性药剂的疗法的受试者。

[0098] 本公开文本的药物组合物包含ts药剂,例如治疗性ts药剂,和一种或多种另外的化合物。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”和“药学上可接受的媒介物”是指一种或多种另外的化合物(即,除ts药剂以外的化合物)。适用于本公开文本的药学上可接受的载体是常规的。特别地,适合于包含温度敏感性药剂的组合物的药物递送的组合物和配制品如前所述(参见例如,Gennaro,A.R.(编辑)Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第18版(1990);和Felton,L.A.(编辑)Remington Essentials of Pharmaceutics,Pharmaceutical Press,London,United Kingdom,第一版,(2013))。

[0099] 通常,所述载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外配制品通常包含注射液,所述注射液包括药学上和生理学上可接受的流体,如作为媒介物的水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可包括,例如,药用级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外,待施用的药物组合物可包含少量的无毒辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。在一些实施方案中,本公开文本的药物组合物包含ts药剂(例如治疗性ts药剂)和一种或多种促进ts药剂掺入细胞中的另外的化合物。在基于RNA的ts药剂的情况下,ts药剂被包封在纳米颗粒中。在一些情况下,纳米颗粒是基于脂质的(例如,lipofectamine)。

[0100] 最适于患者治疗的治疗剂量和方案将随待治疗的疾病或病症以及根据患者的体重和其他参数而变化。有效剂量和治疗方案可以通过常规方法确定,从实验动物中的低剂量开始,然后在监测效果的同时增加剂量,并系统地改变剂量方案。当确定给定受试者的最佳剂量时,临床医生可以考虑许多因素。因素包括患者的体型、患者的年龄、患者的一般状况、所治疗的特定疾病、疾病的严重程度、患者中其他药物的存在等。在考虑动物研究结果和临床文献后选择试验剂量。

动员骨髓细胞

[0101] 在一些实施方案中,方法包括将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员到受试者的脾脏和外周血。在一些实施方案中,方法包括在适于温度敏感性药剂将核酸递送至脾脏中的一个或多个骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)的条件下施用治疗有效量的本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)。

[0102] 在本文公开的方法的一些实施方案中,将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员至脾脏和外周血包括向受试者施用治疗有效量的细胞因子和/或化疗剂。在一些实施方案中,将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员至脾脏和外周血包括向受试者施用治疗有效量的细胞因子。在一些实施方案中,将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员至脾脏和外周血包括向受试者施用治疗有效量的化疗剂。在一些

实施方案中,将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员至脾脏和外周血包括向受试者施用治疗有效量的细胞因子和化疗剂。细胞因子和/或化疗剂可以本领域已知的任何合适的方法施用,包括但不限于通过口服施用、舌下施用、经颊施用、局部施用、直肠施用、经由吸入、透皮施用、皮下注射、静脉内(IV)注射、动脉内注射、肌内注射、心内注射、骨内注射、皮内注射、腹膜内注射、经粘膜施用、阴道施用、玻璃体内施用、关节内施用、关节周围施用、局部施用、表皮施用或其任何组合。在一些实施方案中,细胞因子和/或趋化因子通过皮下注射和/或静脉内注射施用。

[0103] 在一些实施方案中,受试者的骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)在施用组合物(例如,本文所述的任何纳米颗粒组合物)之前至少4周、至少3周、至少2周、至少1周、至少6天、至少5天、至少4天、至少3天、至少2天、至少1天、少于1天、至少18小时、至少16小时、至少12小时、至少8小时、至少6小时或至少1小时被动动员。在一些实施方案中,受试者的骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)在施用组合物之前被动动员连续七天、连续五天、连续四天、连续三天、连续两天或一天。在一些实施方案中,受试者的骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)在施用组合物的同时被动动员。

[0104] 可以使用本领域已知的能够动员骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)的任何细胞因子,包括但不限于粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、甲状旁腺激素(PTH)及其任何组合。在一些实施方案中,细胞因子是G-CSF。

[0105] 在一些实施方案中,将G-CSF以约0.1 μ g/kg至约100 μ g/kg,或约1.0 μ g/kg至约10 μ g/kg的浓度向受试者施用。在一些实施方案中,将G-CSF以约2.5 μ g/kg的浓度向受试者施用。在一些实施方案中,将G-CSF以约10 μ g/kg的浓度向受试者施用。

[0106] 可以使用本领域已知的能够动员骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)的任何化疗剂,包括但不限于普乐沙福、环磷酰胺(CY)、紫杉醇、依托泊苷、POL6326、BKT-140、TG-0054、NOX-A12、SEW2871、BI05192、硼替佐米、SB-251353、FG-4497及其任何组合。在一些实施方案中,化疗剂是普乐沙福。

[0107] 在一些实施方案中,普乐沙福以约1 μ g/kg至约1000 μ g/kg,或约75 μ g/kg至约500 μ g/kg的浓度向受试者施用。在一些实施方案中,普乐沙福以约150 μ g/kg的浓度向受试者施用。在一些实施方案中,普乐沙福以约240 μ g/kg的浓度向受试者施用。

[0108] 在一些实施方案中,将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)动员至脾脏和外周血包括施用治疗有效量的G-CSF和治疗有效量的普乐沙福。在一些实施方案中,将G-CSF和普乐沙福共同施用至受试者。在一些实施方案中,将G-CSF和普乐沙福共同施用至受试者,持续一天、两天、三天、四天或更长时间。在一些实施方案中,将G-CSF在普乐沙福之前施用至受试者。在一些实施方案中,将G-CSF在普乐沙福之前一天、两天、三天、四天或更长时间施用至受试者。在一些实施方案中,将G-CSF在普乐沙福之前一天、两天、三天、四天或更长时间施用至受试者,然后将G-CSF和普乐沙福共同施用至受试者,持续一天、两天、三天、四天或更长时间。在一些实施方案中,将普乐沙福在G-CSF之前施用至受试者。在一些实施方案中,将普乐沙福在G-CSF之前一天、两天、三天、四天或更

长时间施用至受试者。在一些实施方案中,将普乐沙福在G-CSF之前一天、两天、三天、四天或更长时间施用至受试者,然后将G-CSF和普乐沙福共同施用至受试者,持续一天、两天、三天、四天或更长时间。

[0109] 在一些实施方案中,使一个或多个个人细胞与将核酸递送至一个或多个个人细胞的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)接触。在一些实施方案中,核酸包含目的基因或编码目的蛋白。

[0110] 在一些方面,本公开文本的方法涉及使用治疗量的在体外或体内将核酸递送至受试者的细胞的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)。药剂的治疗有效量可以指足以实现预期目的的治疗剂的量。例如,将核酸递送至人细胞以治疗疾病或病症的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的治疗有效量是足以减轻疾病或病症或疾病或病症的一种或多种症状的量。在一些例子中,治疗有效量可以不100%治疗疾病或病症或疾病或病症的症状。然而,疾病或病症的任何已知特征或症状的减少,例如减少至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%可以是治疗性的。

[0111] 在另一个例子中,治疗有效量的能够在受试者中动员骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)的细胞因子和/或趋化因子是足以诱导一种或多种骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)从骨髓动员到外周血中的量。

[0112] 给定的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的治疗有效量将随诸如药剂的性质、施用途径、接受治疗剂的受试者的体型和/或年龄以及施用目的等因素而变化。在每种个体情况下的治疗有效量可以由熟练技术人员根据本领域确定的方法凭经验确定而无需过度实验。

[0113] 受试者可以指活的多细胞脊椎动物生物体,包括人和非人哺乳动物的类别。在一些实施方案中,受试者是人。可以使用本文提供的方法治疗的受试者可以包括哺乳动物受试者,例如兽医或人受试者。受试者可包括胎儿、新生儿、婴儿、儿童和/或成人。在一些实施方案中,选择待治疗的受试者,例如选择将受益于治疗的受试者。

治疗疾病和障碍

[0114] 可受益于施用温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的障碍或疾病的例子包括与一个或多个基因突变、异常端粒长度或一个或多个异常表观遗传修饰相关的那些障碍或疾病。可受益于施用温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的障碍或疾病的其他例子包括癌症、自身免疫性疾病和其中细胞再生是有益的疾病,例如神经损伤或神经退行性障碍、以及失明和耳聋。

[0115] 癌症包括特征在于异常或不受控制的细胞生长的恶性肿瘤。癌症通常与基因突变和异常端粒调节有关。可受益于用ts药剂治疗的示例性癌症包括但不限于心脏癌(例如肉瘤(血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤)、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤)、肺癌(例如支气管癌(鳞状细胞、未分化的小细胞、未分化的大细胞、腺癌)、肺泡(细支气管)癌、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨错构瘤、间皮瘤);胃肠道癌(例如,食管癌(鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤)、胃癌(癌、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胰腺癌(导管腺癌、胰岛素瘤、胰高血糖素瘤、胃泌素瘤、类癌瘤、舒血管肠肽瘤)、小肠癌(腺癌、淋巴瘤、类癌瘤、卡波西氏肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠癌(腺癌、管状腺瘤、绒

毛状腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤)、泌尿生殖道癌(例如,肾癌(腺癌、威尔姆氏肿瘤、肾母细胞瘤、淋巴瘤、白血病)、膀胱和尿道癌(鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌)、前列腺癌(腺癌、肉瘤)、睾丸癌(精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎瘤、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤、脂肪瘤)、肝癌(例如肝细胞瘤(肝细胞癌)、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤、血管瘤)、骨癌(例如骨源性肉瘤(骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞瘤、脊索瘤、骨软骨瘤(骨软骨外生骨疣)、良性软骨瘤、成软骨细胞瘤、软骨粘液纤维瘤、骨样骨瘤和巨细胞瘤)、神经系统癌(例如颅骨癌(骨瘤、血管瘤、肉芽肿、黄瘤、畸形性骨炎)、脑膜癌(脑膜瘤、脑膜肉瘤、神经胶质瘤)、脑癌(星形细胞瘤、髓母细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤、松果体瘤、多形性胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、视网膜母细胞瘤、先天性肿瘤)、脊髓癌(神经纤维瘤、脑膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤)、妇科癌症(例如子宫癌(子宫内膜癌)、宫颈癌(宫颈癌、瘤前宫颈发育不良)、卵巢癌(卵巢癌、浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、子宫内膜样肿瘤、布伦纳瘤、透明细胞癌、未分类癌、颗粒细胞瘤、支持间质细胞瘤、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤)、外阴癌(鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤)、阴道癌(透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄状肉瘤、胚胎性横纹肌肉瘤、输卵管(癌))、血液癌症(例如血液癌(骨髓性白血病(急性和慢性)、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征)、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(恶性淋巴瘤))、皮肤癌(例如恶性黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西氏肉瘤、痣、发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕瘤、牛皮癣)和肾上腺癌(例如成神经细胞瘤)。

[0116] 自身免疫性疾病由异常免疫应答引起,例如产生对自身抗原或受试者自身细胞或组织具有特异性的抗体或细胞毒性T细胞。在一些情况下,自身免疫性疾病限于某些器官(例如,甲状腺炎)或可涉及不同位置的特定组织(例如,Goodpasture病)。可受益于用ts药剂治疗的示例性自身免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、幼年关节炎、胶原诱导的关节炎、佐剂诱导的关节炎、干燥综合征、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、炎性肠病(例如克罗恩病、溃疡性结肠炎)、自身免疫性胃萎缩、寻常型天疱疮、银屑病、白癜风、1型糖尿病、非肥胖糖尿病、重症肌无力、格雷夫氏病、桥本氏甲状腺炎、硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性血小板减少性紫癜、Goodpasture综合征、阿狄森氏病、系统性硬化、多发性肌炎、皮肌炎、自身免疫性溶血性贫血和恶性贫血。

[0117] 在一些实施方案中,受试者是患有神经损伤或患有神经退行性障碍的受试者。神经损伤可指对神经系统(例如脑或脊髓或特定神经元)的创伤,其不利地影响受伤患者的运动和/或记忆。例如,这些患者可能患有构音障碍(运动言语障碍)、轻偏瘫或偏瘫。神经系统损伤可由对神经系统(例如脑或脊髓或特定神经元)的创伤引起,其不利地影响受伤患者的运动和/或记忆。这样的创伤可以由传染物(例如,细菌或病毒)、毒素、跌倒或其他类型的事故造成的损伤、或遗传障碍或出于其他未知原因引起。因此,在一些实施方案中,通过调节患有神经损伤的患者的神经系统中的组织干细胞,其中调节神经系统中的组织干细胞产生神经元和神经胶质细胞,从而修复神经系统中的缺陷,本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)可用于治疗受试者中的神经损伤。在一些实施方案中,编码各种神经营养因子例如脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、神经营养因子-3、神经营养因子-4、睫状神经营养因子、神经胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)的温度敏感性

药剂可用于治疗此类患者。在一些实施方案中,患者可能患有神经损伤,例如由事故或中风引起的脑或脊髓损伤。

[0118] 神经退行性疾病是其中脑和/或脊髓细胞丢失的病症。神经退行性疾病由神经元或它们的髓鞘退化引起,这随时间导致功能障碍和残疾。产生的病症可引起运动问题(例如共济失调)和记忆问题(例如痴呆)。因此,在一些实施方案中,通过调节患有神经退行性疾病的患者的神经系统中的组织干细胞,其中调节神经系统中的组织干细胞产生神经元和神经胶质细胞,从而修复神经系统中的缺陷,本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)可用于治疗受试者中的神经退行性疾病。在一些实施方案中,药剂调节受试者的神经系统并恢复疾病的退行性病症。示例性神经退行性疾病包括但不限于:肾上腺脑白质营养不良(ALD)、酒精中毒、亚历山大病、阿尔珀病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化(葛雷克氏病)、共济失调性毛细血管扩张症、贝敦氏病(也称为Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten病)、牛海绵状脑病(BSE)、卡纳万病、脑瘫、科克因综合征、皮质基底节变性、克雅二氏病、家族性致命性失眠、额颞叶变性、亨廷顿病、HIV相关痴呆、肯尼迪病、克腊伯氏病、路易体痴呆、神经疏螺旋体病、马查多·约瑟夫病(3型脊髓小脑性共济失调)、多系统萎缩、多发性硬化、发作性睡病、尼曼皮克病、帕金森病、佩梅病、皮克病、原发性侧索硬化、朊病毒病、进行性核上性麻痹、雷弗素姆氏病、山德霍夫氏病、谢耳德氏病、继发于恶性贫血的亚急性脊髓联合变性、Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten病(也称为贝敦氏病)、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩、Steele-Richardson-Olszewski病、脊髓痨、中毒性脑病。

[0119] 因此,向受试者施用温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)以减轻或改善与特定障碍相关的症状。癌症治疗的治疗终点可包括肿瘤大小或体积的减小、肿瘤血管生成的减小或肿瘤转移的减少。如果肿瘤已经被去除,另一个治疗终点可以是去除的组织或器官的再生。可以使用本领域的方法测量癌症治疗的有效性,例如肿瘤的成像或检测肿瘤标记物或癌症存在的其他指标。治疗自身免疫性疾病的治疗终点可包括自身免疫应答的降低。自身免疫疾病治疗的有效性可以使用本领域的方法测量,例如测量自身免疫抗体,其中在所治疗的受试者中此类抗体的减少表明治疗是成功的。治疗神经退行性障碍的治疗终点可包括神经退行性相关缺陷的减少,例如运动、记忆或行为缺陷的增加。治疗神经退行性障碍的有效性可以使用本领域的方法测量,例如通过测量认知损害,其中在所治疗的受试者中这种损害的减少表明治疗是成功的。治疗神经损伤的治疗终点可包括损伤相关缺陷(例如运动、记忆或行为缺陷的增加)的减少。治疗神经损伤的有效性可以使用本领域的方法测量,例如通过测量活动性和灵活性,其中在所治疗的受试者中这样的增加表明治疗是成功的。治疗不需要100%有效性。疾病(或其症状)减少至少约10%、约15%、约25%、约40%、约50%或更多(例如相对于在人细胞中不存在药剂治疗)被认为是有效的。

[0120] 例如,通过向受试者的血流施用本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂),使得所述药剂引入/接触血管内皮细胞并提高其质量,从而治疗受试者中的动脉粥样硬化和/或冠心病,本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)还可用于治疗有需要的受试者中的动脉粥样硬化和/或冠心病。

[0121] 本公开文本的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)还可用于在一个或多个细胞和/或有需要的受试者中提供对一种或多种基因毒性剂的抗性。

[0122] 可受益于施用温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的障碍或疾病的例子包

括与一个或多个基因突变、异常端粒长度或一个或多个异常表观遗传修饰相关的那些障碍或疾病。可受益于施用温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)的障碍或疾病的其他例子包括癌症、自身免疫性疾病和其中细胞再生是有益的疾病,例如神经损伤或神经退行性障碍、以及失明和耳聋。

[0123] 除非另外说明,否则在此使用的所有技术和科学术语具有如本公开文本所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。除非上下文另外清楚地说明,否则单数术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”以及“所述(the)”包括复数指示物。类似地,除非上下文另外清楚地说明,否则单词“或”旨在包括“和”。因此,“包含A或B”意指包括A、或B、或A和B。还应当理解,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小,以及所有分子量或分子质量值是近似的,并且被提供用于描述。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于本公开文本的实践或测试,但下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用以其整体并入。在存在冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。

示例性实施方案

1. 一种用于瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法,所述方法包括:

i) 将包含所述温度敏感性药剂的一个或多个细胞在诱导所述温度敏感性活性的允许温度下孵育一定的时间段,所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述一个或多个细胞中产生效果;以及

ii) 在非允许温度下孵育所述一个或多个细胞,其中所述非允许温度降低所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性,

其中所述温度敏感性药剂包括治疗剂,并且所述效果包括治疗效果。

2. 根据实施方案1所述的方法,所述方法在步骤i)之前进一步包括:使所述一个或多个细胞与所述温度敏感性药剂接触。

3. 根据实施方案2所述的方法,其中所述一个或多个细胞在与所述温度敏感性药剂接触时处于所述允许温度下。

4. 根据实施方案1-3中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向需要所述治疗效果的受试者施用所述一个或多个细胞。

5. 根据实施方案1-3中任一项所述的方法,其中在非允许温度下孵育所述一个或多个细胞包括向需要所述治疗效果的受试者施用所述一个或多个细胞,其中所述受试者的体温是所述非允许温度。

6. 根据实施方案4或5所述的方法,其中在向所述受试者施用所述一个或多个细胞之前,将所述一个或多个细胞在所述非允许温度下进一步孵育。

7. 根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

8. 根据实施方案7所述的方法,其中所述治疗效果包括所述细胞分化成期望的细胞类型。

9. 根据实施方案8所述的方法,其中所述期望的细胞类型选自神经元、神经胶质细胞和上皮细胞。

10. 根据实施方案2-9中任一项所述的方法,其中在使所述一个或多个细胞与所述

温度敏感性药剂接触之前将所述一个或多个细胞从所述受试者分离。

11. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法, 其中所述受试者的一个或多个细胞包含所述温度敏感性药剂, 其中所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度低于所述受试者的体温, 所述方法包括:

i) 将所述受试者的体温降低至所述允许温度;

ii) 将所述降低的体温维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果; 以及

iii) 将所述受试者的体温升高回正常体温。

12. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂的温度敏感性活性的方法, 其中所述温度敏感性药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导, 并且其中所述允许温度低于所述受试者的体温, 所述方法包括:

i) 将所述受试者的体温降低至所述允许温度;

ii) 向所述受试者的一个或多个细胞施用所述温度敏感性药剂;

iii) 将所述降低的体温维持一定的时间段, 所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果; 以及

iv) 将所述受试者的体温升高回正常体温, 其中步骤(i)在步骤(ii)之前、之后或同时进行。

13. 根据实施方案12所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂全身施用。

14. 根据实施方案13所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂静脉内施用。

15. 根据实施方案12所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂施用至所述受试者的特定组织或器官。

16. 根据实施方案15所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过硬膜外注射施用至脑和脊髓。

17. 根据实施方案15所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过经皮注射施用至靶器官中。

18. 根据实施方案15所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过内窥镜检查使用注射针头导管施用至靶器官中。

19. 根据实施方案15所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过血管导管施用至靶器官中。

20. 根据实施方案17-19中任一项所述的方法, 其中所述靶器官选自肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺、脾脏、心脏、脑、脊髓、皮肤、眼、肺、肠、胸腺、骨髓、骨和软骨。

21. 根据实施方案12所述的方法, 其中将所述温度敏感性药剂通过吸入施用。

22. 根据实施方案11-21中任一项所述的方法, 其中改变受试者的体温包括使用目标温度管理(TTM)程序, 其中所述TTM程序包括向所述受试者施加由冷却导管、冷却毯和冰块组成的组中的一种。

23. 根据实施方案11-22中任一项所述的方法, 其中所述受试者是哺乳动物受试者, 任选地其中所述受试者是人。

24. 根据实施方案11-23中任一项所述的方法, 其中所述温度敏感性药剂包括治疗

剂,并且所述效果包括治疗效果。

25. 根据实施方案24所述的方法或根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述治疗剂由温度敏感性病毒载体的异源核酸的编码区编码。

26. 根据实施方案25所述的方法,其中所述温度敏感性病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

27. 根据实施方案26所述的方法,其中所述温度敏感性病毒载体是甲病毒。

28. 根据实施方案27所述的方法,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

29. 根据实施方案26所述的方法,其中所述温度敏感性病毒载体是仙台病毒。

30. 根据实施方案25-29中任一项所述的方法,其中所述治疗剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

31. 根据实施方案25-29中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是蛋白质。

32. 根据实施方案31所述的方法,其中所述蛋白质是转录因子,任选地其中所述转录因子选自人神经元素3(NGN3)和人ETS易位变体2(ETV2)。

33. 根据实施方案31所述的方法,其中所述蛋白质是生长因子,任选地其中所述生长因子选自脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)。

34. 根据实施方案25-33中任一项所述的方法,其中所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性病毒载体的复制和转录。

35. 根据实施方案24所述的方法或根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述治疗剂由温度敏感性自我复制RNA的编码区编码。

36. 根据实施方案35所述的方法,其中所述自我复制RNA包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

37. 根据实施方案36所述的方法,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

38. 根据实施方案35-37中任一项所述的方法,其中所述治疗剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

39. 根据实施方案35-37中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是蛋白质。

40. 根据实施方案39所述的方法,其中所述蛋白质是转录因子,任选地其中所述转录因子选自人神经元素3(NGN3)和人ETS易位变体2(ETV2)。

41. 根据实施方案39所述的方法,其中所述蛋白质是生长因子,任选地其中所述生长因子选自脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)。

42. 根据实施方案35-41中任一项所述的方法,其中所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性自我复制RNA的复制和转录中的之一或二者。

43. 根据实施方案25-42中任一项所述的方法,其中所述编码区与启动子可操作地连接。

44. 根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中足以使所述温度敏感性活性产生治疗效果的所述时间段在约12小时至约12周的范围内,任选地其中所述时间段为1至7天。

45. 根据实施方案11-43中任一项所述的方法,其中足以在所述受试者中诱导效果

的所述时间段是约12小时至约7天,任选地其中所述时间段是约12小时至约72小时。

46. 根据实施方案1-45中任一项所述的方法,其中所述允许温度在30℃至36℃或38℃至50℃的范围内。

47. 根据实施方案46所述的方法,其中所述允许温度是33℃±0.5℃。

48. 根据实施方案46或实施方案47所述的方法,其中所述非允许温度是37℃±0.5℃。

49. 根据实施方案1-48中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是人细胞。

50. 根据实施方案49所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是成体干细胞、组织干细胞、祖细胞、胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

51. 根据实施方案50所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞选自造血干细胞、间充质干细胞、脂肪干细胞、神经元干细胞和生殖干细胞。

52. 根据实施方案49所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是体细胞、成熟细胞或分化的细胞。

53. 根据实施方案52所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞选自表皮细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、肝细胞、上皮细胞、肌细胞、软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、胰腺细胞、胰腺β细胞、角质细胞、红细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、神经元、神经胶质细胞、神经细胞、星形胶质细胞、生殖细胞、精细胞和卵母细胞。

54. 根据实施方案49所述的方法,其中所述一个或多个个人细胞是人骨髓细胞。

55. 根据实施方案54所述的方法,其中所述人骨髓细胞选自造血干细胞、间充质干细胞和内皮干细胞。

56. 根据实施方案55所述的方法,其中所述造血干细胞是CD34+。

57. 根据实施方案25-56中任一项所述的方法,其中所述温度敏感性病毒载体或所述温度敏感性自我复制RNA包含插入12-18个核苷酸的非结构蛋白编码区,其中所述插入导致在所述nsP2的β片层5与β片层6之间包含4至6个另外的氨基酸的非结构蛋白2(nsP2=解旋酶蛋白酶)的表达,任选地其中所述另外的氨基酸导致所述病毒载体或所述自我复制RNA的温度敏感性。

58. 根据实施方案57所述的方法,其中所述另外的氨基酸包含选自SEQ ID NO:38(GCGRT)、SEQ ID NO:39(TGAAA)和SEQ ID NO:40(LRPHP)的一个序列。

59. 根据实施方案57所述的方法,其中所述另外的氨基酸包含SEQ ID NO:39(TGAAA)的序列。

60. 根据实施方案59所述的方法,其中所述NsP2的氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:29-36的一个序列。

61. 一种温度敏感性药剂,其中所述药剂是温度敏感性病毒载体或温度敏感性自我复制RNA,其包含插入12-18个核苷酸的非结构蛋白编码区,其中所述插入导致在所述nsP2的β片层5与β片层6之间包含4至6个另外的氨基酸的非结构蛋白2(nsP2=解旋酶蛋白酶)的表达,任选地其中所述另外的氨基酸导致所述病毒载体或所述自我复制RNA的温度敏感性。

62. 根据实施方案61所述的温度敏感性药剂,其中所述另外的氨基酸包含选自SEQ ID NO:38(GCGRT)、SEQ ID NO:39(TGAAA)和SEQ ID NO:40(LRPHP)的一个序列。

63. 根据实施方案61所述的温度敏感性药剂,其中所述另外的氨基酸包含SEQ ID NO:39(TGAAA)的序列。

64. 根据实施方案63所述的温度敏感性药剂,其中所述NsP2的氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:29-36的一个序列。

65. 根据实施方案61-64中任一项所述的温度敏感性药剂,其中所述药剂是温度敏感性甲病毒载体。

66. 根据实施方案61-64中任一项所述的温度敏感性药剂,其中所述药剂是包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子的温度敏感性自我复制RNA。

67. 根据实施方案65或实施方案66所述的温度敏感性药剂,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

68. 根据实施方案65或实施方案66所述的温度敏感性药剂,其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

69. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂(ts药剂)的温度敏感性活性的方法,其中所述受试者的身体表面处或附近的一个或多个细胞包含所述ts药剂,其中所述ts药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导,并且其中所述允许温度是所述受试者的表面体温,所述方法包括:

i) 将所述受试者的表面体温在所述允许温度下维持一定的时间段,所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果;以及

ii) 将所述受试者的表面体温升高至非允许温度,持续一定的时间段,所述时间段足以使所述受试者中的所述温度敏感性活性停止。

70. 一种用于在受试者中瞬时诱导温度敏感性药剂(ts药剂)的温度敏感性活性的方法,其中所述ts药剂的温度敏感性活性在允许温度下被诱导,并且其中所述允许温度是所述受试者的表面体温,所述方法包括:

i) 将所述ts药剂施用至所述受试者的身体表面处或附近的一个或多个细胞;以及

ii) 将所述受试者的表面体温在所述允许温度下维持一定的时间段,所述时间段足以使所述温度敏感性活性在所述受试者中诱导效果。

71. 根据实施方案70所述的方法,所述方法进一步包括iii) 将所述受试者的表面体温升高至非允许温度,持续一定的时间段,所述时间段足以使所述受试者中的所述温度敏感性活性停止。

72. 根据实施方案70或实施方案71所述的方法,其中将所述温度敏感性药剂皮内或皮下施用。

73. 根据实施方案70或实施方案71所述的方法,其中将所述温度敏感性药剂肌肉内施用。

74. 根据实施方案69-73中任一项所述的方法,其中所述非允许温度高于36℃,并且所述允许温度低于36℃,任选地其中所述允许温度为约31℃至约34℃或约33℃±0.5℃,并且所述非允许温度为37℃±0.5℃。

75. 根据实施方案69-74中任一项所述的方法,其中药剂由所述ts药剂的编码区编码或所述ts药剂包含药剂,并且所述效果包括药物效果,任选地其中所述药剂是治疗剂并且所述药物效果是治疗效果,或其中所述药剂是预防剂并且所述药物效果是预防效果。

76. 根据实施方案69-75中任一项所述的方法, 其中所述ts药剂是温度敏感性病毒载体并且所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性病毒载体的复制和转录。

77. 根据实施方案76所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

78. 根据实施方案76所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是甲病毒, 任选地其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

79. 根据实施方案76所述的方法, 其中所述温度敏感性病毒载体是仙台病毒。

80. 根据实施方案69-75中任一项所述的方法, 其中所述ts药剂是温度敏感性自我复制RNA, 并且所述温度敏感性活性包括所述温度敏感性自我复制RNA的复制和转录中的之一或二者。

81. 根据实施方案80所述的方法, 其中所述自我复制RNA包含缺乏甲病毒病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

82. 根据实施方案81所述的方法, 其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

83. 根据实施方案81所述的方法, 其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

84. 根据实施方案69-83中任一项所述的方法, 其中所述药剂选自非编码RNA、siRNA、shRNA和核酸内切酶编辑系统。

85. 根据实施方案69-83中任一项所述的方法, 其中所述药剂包含蛋白质。

86. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述蛋白质包含病原体的抗原。

87. 根据实施方案86所述的方法, 其中所述病原体包括病毒、细菌、原生动物和真菌中的一种或多种。

88. 根据实施方案86或实施方案87所述的方法, 其中所述抗原包含所述病原体的表面蛋白或其片段。

89. 根据实施方案69-88中任一项所述的方法, 其中足以使所述温度敏感性活性产生效果的所述时间段在约12小时至约12周的范围, 任选地其中所述时间段为1至7天。

90. 根据实施方案69-88中任一项所述的方法, 其中足以在所述受试者中诱导效果的所述时间段是约12小时至约7天, 任选地其中所述时间段是约12小时至约72小时。

91. 一种用于在受试者中刺激针对病原体的免疫应答的免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物包含赋形剂和温度敏感性药剂(ts药剂), 其中所述ts药剂是编码所述病原体的抗原的温度敏感性病毒载体或温度敏感性自我复制RNA, 并且其中所述ts药剂能够在允许温度下表达所述抗体但在非允许温度下不表达所述抗原。

92. 根据实施方案91所述的组合物, 其中所述病原体包括病毒、细菌、原生动物和真菌中的一种或多种。

93. 根据实施方案91或实施方案92所述的组合物, 其中所述抗原包含所述病原体的表面蛋白或其片段。

94. 根据实施方案93所述的组合物, 其中所述病原体是病毒, 并且所述病毒不同于所述病毒载体。

95. 根据实施方案94所述的组合物, 其中所述病毒是冠状病毒并且所述抗原包含所述冠状病毒的刺突蛋白或其片段。

96. 根据实施方案95所述的组合物,其中所述冠状病毒是2019-nCoV并且所述抗原包含所述2019-nCoV的受体结合结构域(RBD)。

97. 根据实施方案96所述的组合物,其中所述RBD的氨基酸序列包含SEQ ID NO: 44,或与SEQ ID NO: 44至少75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

98. 根据实施方案95所述的组合物,其中所述冠状病毒是2019-nCoV并且所述抗原包含所述刺突蛋白的胞外区,所述胞外区包含SEQ ID NO: 41的残基16-1213的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 41至少75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

99. 根据实施方案91-98中任一项所述的组合物,其中所述非允许温度高于36℃,并且所述允许温度低于36℃,任选地其中所述允许温度为约31℃至约34℃或约33℃±0.5℃,并且所述非允许温度为37℃±0.5℃。

100. 根据实施方案91-99中任一项所述的组合物,其中所述ts药剂是温度敏感性自我复制RNA。

101. 根据实施方案100所述的组合物,其中所述自我复制RNA包含缺乏病毒结构蛋白编码区的甲病毒复制子。

102. 根据实施方案101所述的组合物,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

103. 根据实施方案101所述的组合物,其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒。

104. 根据实施方案91-99中任一项所述的组合物,其中所述ts药剂是温度敏感性病毒载体。

105. 根据实施方案104所述的组合物,其中所述病毒载体选自仙台病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和甲病毒。

106. 根据实施方案105所述的组合物,其中所述甲病毒选自委内瑞拉马脑炎病毒、辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒。

107. 根据实施方案105所述的组合物,其中所述病毒载体是仙台病毒。

108. 根据实施方案69-90中任一项所述的方法或根据实施方案91-107中任一项所述的组合物,其中所述受试者是哺乳动物受试者,任选地其中所述受试者是人。

109. 根据实施方案91-108中任一项所述的组合物,其中所述病原体是哺乳动物病原体,任选地其中所述病原体是人病原体。

110. 一种用于在哺乳动物受试者中刺激针对病原体的免疫应答的方法,所述方法包括向所述哺乳动物受试者施用根据实施方案109所述的免疫原性组合物以在所述哺乳动物受试者中刺激针对所述抗原的免疫应答,任选地其中所述哺乳动物受试者是人受试者。

111. 根据实施方案110所述的方法,其中将所述免疫原性组合物:

i) 皮内或皮下施用;或

ii) 肌肉施用。

112. 根据实施方案110所述的方法,其中将所述免疫原性组合物鼻内施用。

实施例

[0124] 缩写: Aura (奥拉病毒); BFV (巴马森林病毒); GFP (绿色荧光蛋白); GOI (目的基因); IRES (内部核糖体进入位点); LUC (萤光素酶); OD (光密度); ONNV (奥-奈氏病毒); RBD

(受体结合结构域);RRV(罗斯河病毒);SeV(仙台病毒);SeVts(温度敏感性仙台病毒);SFV(塞姆利基森林病毒);shRNA(短发夹RNA);SINV(辛德比斯病毒);srRNA(自我复制RNA);ts(温度敏感性);ts药剂(温度敏感性药剂);VEEV(委内瑞拉马脑炎病毒);和WEEV(西部马脑炎病毒)。

[0125] 提供以下实施例以说明某些特定特征和/或实施方案。实施例不旨在限制所要求保护的公开内容。

实施例1:温度敏感性药剂

[0126] 本实施例描述了在低于或高于正常体温的温度下起作用,但在正常体温下不起作用或显示出降低的功能的温度敏感性药剂(ts药剂)。ts药剂适用于离体、半体内和体内疗法。将温度敏感性病毒载体和自我复制RNA工程化以表达目的基因(GOI)、短发夹RNA(shRNA)、长的非编码RNA和/或一个或多个其他遗传元件。例如,具有温度敏感性突变的蛋白质在较低温度(例如,30℃)下起作用,但在正常体温(例如,37℃)下不起作用。除非另有规定,否则正常体温为正常人体温度37℃±0.5℃。

实施例2:温度敏感性仙台病毒载体(SeVts)

[0127] 本实施例描述了温度敏感性仙台病毒载体(SeVts),其可用于温度特异性基因表达。仙台病毒载体基于仙台病毒,即一种副粘病毒亚科的单链RNA病毒。SeV18/TS15ΔF是温度敏感性仙台病毒载体,当保持在32℃-35℃下时允许病毒复制和基因表达。然而,在37℃及更高的非允许温度下病毒复制停止(Ban等人.,PNAS 2011)。

实施例3:温度敏感性自我复制RNA(srRNA)

[0128] 本实施例描述了如下发现,即在委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)载体中编码的nsP2蛋白中的突变展现出温度敏感性。温度敏感性系统允许目的基因(GOI)在30℃-33℃下表达,但在37℃及更高温度下不表达。srRNA载体允许GOI比编码GOI的合成RNA更高的表达。当温度转变至37℃(例如,非允许温度)时,GOI的表达被关闭。下文描述的特定温度敏感性突变(突变2)是在甲病毒中的高度保守区。与仙台病毒载体(SeVts)相比,srRNAts对于一些应用可能更有吸引力,因为srRNAts可用于非病毒RNA表达系统。

材料和方法

细胞培养

[0129] 人脂肪干细胞来源的iPS细胞系(ADSC-iPS细胞)购自System Biosciences(加利福尼亚州帕洛阿尔托)。根据标准的hPSC培养方法,细胞常规地被维持为未分化的人多能干细胞(hPSC)。简言之,在补充有100ng/ml FGF2的StemFit basic02(Ajinomoto,日本)中培养细胞。此外,在包被有层粘连蛋白-511底物(iMatrix-511,Nippi,日本)的细胞培养皿上培养细胞。

VEEV载体

[0130] 基于公众可获得的序列信息(T7-VEE-IRES-Puro,下文称为“srRNA1wt”),使用合成的DNA片段组装VEEV载体质粒。根据Yoshioka等人,2013,最初如Petrakova等人,2005中所述得到VEEV载体骨架。通过插入诱变和大规模平行测序(Beitzel等人,2010)鉴定的7480个候选序列用于得到潜在的温度敏感性突变体。通过转座子介导的在VEEV基因组中插入15bp进行最初的大规模筛选(图1A)。随后,将能够在30℃或40℃下增殖的大量15bp插入VEEV突变体分离。尽管这些数据提供了用于进一步研究的初始突变体,但不知道这些序列

是否展现出温度敏感性,例如在32℃或33℃下的允许性和在37℃下的非允许性。从总共7480个候选突变体序列(来自Beitzel等人,2010的数据集S1)中选择三种突变体序列—突变体1(ts1,图1B)、突变体2(ts2,图1C)和突变体3(ts3,图1D)。合成这些突变体DNA片段(图2)并将其克隆到VEEV载体中,并命名为srRNA1ts1(突变体1)、srRNA1ts2(突变体2)、srRNA1ts3(突变体3)。设计突变体4,其包括病毒序列的5'-区域(5'-UTR和已知包括51-nt保守序列元件(CSE)的RNA依赖性RNA聚合酶的N末端蛋白序列的一部分)。在这种情况下,核苷酸被系统地改变为热稳定性较差的变体(例如,G→A),同时保持氨基酸序列(图3)。将srRNA1ts2中该区域的序列替换以产生srRNA1ts4(即,含有突变体4和突变体2二者)。根据Yoshioka等人,2013,从这些载体产生合成RNA。

结果

评估srRNA1ts2-GFP和srRNA1ts3-GFP在30℃、32℃和37℃下的温度敏感性

[0131] 将ADSC-iPSC细胞以80,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1wt-GFP、srRNA1ts2-GFP或srRNA1ts3-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus)转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在30℃、32℃或37℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。在20小时和48小时拍摄相对比和荧光图像。图4A显示野生型(srRNA1wt-GFP)在37℃下强烈表达GFP,但在30℃和32℃下均仅微弱表达GFP。相比之下,突变体2(srRNA1ts2-GFP)在30℃和32℃下表达GFP,但在37℃下不表达GFP。突变体3(srRNA1ts3-GFP)在30℃和32℃下表达GFP,但在37℃下也表达GFP。基于这些结果,选择突变体2用于进一步开发。如所预期的,与通过编码GFP的合成mRNA的单次转染实现的GFP表达水平相比,srRNA显示出高得多的GFP表达(图4B)。

评估srRNA1ts1-GFP和srRNA1ts2-GFP在32℃下的温度敏感性

[0132] 将ADSC-iPSC细胞以50,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1wt-GFP、srRNA1ts2-GFP或srRNA1ts1-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus)转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在32℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。在24、48、72、96、120、144、168、192、240和288小时拍摄相对比和荧光图像。

[0133] 图5显示了结果。野生型(srRNA1wt-GFP)的GFP表达在24小时开始并持续直到观察期结束(在288小时),但在整个时间过程中非常弱。相比之下,突变体2(srRNA1ts2-GFP)的GFP表达在整个时间过程中非常强烈。突变体1(srRNA1ts1-GFP)完全不表达GFP(基于24小时和168小时的观察)。基于这些结果,选择突变体2用于进一步开发。

评估srRNA1ts2-GFP和srRNA1ts4-GFP在32℃、33℃和37℃下的温度敏感性

[0134] 将ADSC-iPSC细胞以50,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1ts2-GFP或srRNA1ts4-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus)转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在32℃、33℃或37℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。在20、48和96小时拍摄相对比和荧光图像。

[0135] 图6显示了结果。在32℃和33℃下,突变体2(srRNA1ts2-GFP)的GFP表达早在20小

时就开始,但在48小时显著增加,并且在96小时进一步增加。GFP的表达在33℃下比在32℃下更强。与上述实验一致,在37℃下GFP完全不表达。srRNA1ts4-GFP(含有突变体2和突变体4二者)显示与srRNA1ts2-GFP相似的温度曲线,但GFP表达总体上弱得多。基于这些结果,选择突变体2用于进一步开发。

评估srRNA1ts2-GFP在32℃下的温度敏感性

[0136] 将ADSC-iPSC细胞以80,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1ts2-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在32℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。每天更换培养基。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶(pac)选择基因,因此,可以使用嘌呤霉素进行选择。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。对于使用嘌呤霉素选择的细胞,在48小时和72小时添加嘌呤霉素。在24、48、72、96、144、168、192小时拍摄相对比和荧光图像。

[0137] 图7显示了结果。在32℃下,srRNA1ts2-GFP的GFP表达早在24小时就开始,但在48小时显著增加,并且在72小时和96小时达到峰值。GFP的表达持续到观察期结束(在192小时)。GFP的表达模式似乎没有因添加嘌呤霉素而改变。

评估24小时后从32℃转换至37℃时

srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。

[0138] 将ADSC-iPSC细胞以80,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1ts2-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在32℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。每天更换培养基。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶(pac)选择基因,因此,可以使用嘌呤霉素进行选择。在不存在(上图)或存在(下图)1μg/ml嘌呤霉素的情况下进行实验。对于使用嘌呤霉素选择的细胞,在48小时和72小时添加嘌呤霉素。为了测试温度变化的影响,在24小时(转染后24小时)将细胞培养物转移到维持在37℃下的CO₂培养箱中。在24、48、72、96、144、168、192小时拍摄相对比和荧光图像。

[0139] 图8显示了结果。在32℃下,srRNA1ts2-GFP的GFP表达早在24小时就开始,但甚至在24小时温度转换至37℃后仍继续增加。GFP的表达在48小时达到峰值,然后开始降低。到96小时,GFP表达变得非常弱,并且到144小时,GFP表达不再被检测到。随后,直到192小时观察期结束都没有GFP表达。因此,当温度从33℃(允许温度)转变至37℃(非允许温度)时,GOI(在此由GFP表示)的表达被快速关闭。GFP的表达模式似乎没有因添加嘌呤霉素而改变。

评估48小时后从32℃转换至37℃时

srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。

[0140] 将ADSC-iPSC细胞以80,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后,用srRNA1ts2-GFP转染细胞。对于转染,用与1μl JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的0.5μg合成RNA(srRNA)处理24孔板的每个孔,最终体积为50μl。向细胞中添加转染复合物后,添加450μl培养基。将细胞在32℃下孵育。转染后6小时,更换培养基以去除转染复合物。每天更换培养基。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶

(pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素进行选择。在不存在(上图)或存在(下图) $1\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的情况下进行实验。对于使用嘌呤霉素选择的细胞, 在48小时和72小时添加嘌呤霉素。为了测试温度变化的影响, 在48小时(转染后48小时)将细胞培养物转移到维持在 37°C 下的 CO_2 培养箱中。在24、48、72、96、144、168、192小时拍摄相对比和荧光图像。

[0141] 图9显示了结果。在 32°C 下, srRNA1ts2-GFP的GFP表达早在24小时就开始并且在48小时进一步增加。即使在48小时将温度转换至 37°C 后, GFP的表达仍持续到96小时。但GFP表达从72小时开始下降, 并且到96小时GFP表达变得非常弱。到144小时, 几乎检测不到GFP表达, 并且到192小时完全关闭。因此, 当温度从 33°C (允许温度) 转变至 37°C (非允许温度) 时, GOI (在此由GFP表示) 的表达被快速关闭。GFP的表达模式似乎没有因添加嘌呤霉素而改变。

评估72小时后从 32°C 转换至 37°C 时

srRNA1ts2-GFP的温度敏感性。

[0142] 将ADSC-iPSC细胞以80,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后, 用srRNA1ts2-GFP转染细胞。对于转染, 用与 $1\mu\text{l}$ JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的 $0.5\mu\text{g}$ 合成RNA (srRNA) 处理24孔板的每个孔, 最终体积为 $50\mu\text{l}$ 。向细胞中添加转染复合物后, 添加 $450\mu\text{l}$ 培养基。将细胞在 32°C 下孵育。转染后6小时, 更换培养基以去除转染复合物。每天更换培养基。srRNA1ts2-GFP载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶 (pac) 选择基因, 因此, 可以使用嘌呤霉素进行选择。在不存在(上图)或存在(下图) $1\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的情况下进行实验。对于使用嘌呤霉素选择的细胞, 在48小时和72小时添加嘌呤霉素。为了测试温度变化的影响, 在72小时(转染后72小时)将细胞培养物转移到维持在 37°C 下的 CO_2 培养箱中。在24、48、72、96、144、168、192小时拍摄相对比和荧光图像。

[0143] 图10显示了结果。在 32°C 下, srRNA1ts2-GFP的GFP表达早在24小时就开始并且在48小时进一步增加。即使在48小时将温度转换至 37°C 后, GFP的表达仍持续到96小时。但GFP表达从72小时开始下降, 并且到144小时GFP表达变得非常弱。到168小时, 几乎检测不到GFP表达, 并且到192小时完全关闭。因此, 当温度从 33°C (允许温度) 转变至 37°C (非允许温度) 时, GOI (在此由GFP表示) 的表达被快速关闭。GFP的表达模式似乎没有因添加嘌呤霉素而改变。

评估srRNA1ts2-GFP在成纤维细胞中的温度敏感性

[0144] 将人新生真皮成纤维细胞(第20代的HDFn)以10,000个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。24小时后, 用srRNA1wt-GFP转染细胞。通过使用JetMessenger (Polyplus) 转染试剂或Lipofectamine MessengerMax (Thermo-Fisher) 进行srRNA1wt-GFP ($0.5\mu\text{g}$ 合成RNA) 的转染。将细胞在 37°C 下孵育。为了观察已知抑制干扰素应答的B18R的作用, 在不存在(上图)或存在(下图) 200ng/ml B18R的情况下进行转染和细胞培养。每天更换培养基。在0、24、48和96小时拍摄相对比和荧光图像。

[0145] 图11显示了结果。在不存在B18R的情况下, 几乎没有检测到GFP的表达。相比之下, 在存在B18R的情况下, srRNA1wt-GFP的GFP表达早在24小时就开始并且持续直到48小时和72小时。GFP在GFP+细胞中强烈表达, 但GFP+细胞的频率不高。这很可能是由于srRNA1wt-GFP对人原代成纤维细胞的低转染效率。

比对对应于突变体2(ts2)的甲病毒家族的氨基酸序列

[0146] 如图12所示, 甲病毒的nsP2蛋白的结构, 甚至在氨基酸水平上在家族成员中是高

度保守的。基于3D结构模型(Russo等人,2006),其中5个氨基酸SEQ ID NO:39(TGAAA)插入突变体2中的蛋白质区域是两个 β 片层结构之间的转折点,其在甲病毒家族成员中也是高度保守的。因此,突变体2的温度敏感性极有可能可以转移到其他甲病毒家族成员,包括Aura(奥拉病毒)、WEEV(西部马脑炎病毒)、BFV(巴马森林病毒)、ONNV(奥-奈氏病毒)、RRV(罗斯河病毒)、SFV(塞姆利基森林病毒)、和SINV(辛德比斯病毒)。用于在各种甲病毒的nsP2中插入以赋予温度敏感性的合适位置列于表3-1中。

表3-1.甲病毒nsP2序列和插入位点

甲病毒	NCBI 登录号	插入位点(:) 氨基酸位置
委内瑞拉马脑炎病毒	NP_740697	586:587
奥拉病毒	NP_819011	596:597
西部马脑炎病毒	CAA52868	683:684
巴马森林病毒	NP_818996	588:589
奥-奈氏病毒	AAC97204	1123:1124
罗斯河病毒	NP_740679	587:588
塞姆利基森林病毒	NP_463457	1125:1126
辛德比斯病毒	AF492770_1	1137:1138

实施例4:温度敏感性抗体

[0147] 本实施例描述了温度敏感性抗体。将在允许温度(例如,32℃)下起作用并且在非允许温度(例如,37℃)下不起作用或显示降低的功能的抗体通过插入或取代氨基酸序列进行工程化。温度敏感性抗体可以通过插入编码温度敏感性螺旋卷曲过渡肽(-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-,如SEQ ID NO:37所示)的接头寡核苷酸来产生,如(Kamihara和Iijima,2000; Merutka和Stellwagen,1990)所述。以这种方式,可以产生工程化抗体,其在允许温度(例如32℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。可替代地,可以使用在低温环境中自然生活的动物(例如大西洋鲑鱼和虾)的抗体DNA序列,因为这些抗体在允许温度(低温)下最佳地起作用,但在非允许温度(例如37℃)下显示出降低的功能。

实施例5:温度敏感性蛋白

[0148] 本实施例描述了温度敏感性蛋白。此类蛋白质在允许温度(例如,32℃)下起作用并且在非允许温度(例如,37℃)下不起作用或显示低功能。将温度敏感性蛋白通过取代氨基酸序列进行工程化。可替代地,可以使用从在低温环境中自然生活的动物(例如大西洋鲑鱼和虾)获得的温度敏感性蛋白,因为这些蛋白质在允许温度(低温)下最佳地起作用,但在非允许温度(例如37℃)下显示出降低的功能(例如虾碱性磷酸酶)。

实施例6:温度敏感性RNA

[0149] 本实施例描述了温度敏感性RNA分子。RNA分子包括但不限于mRNA、mRNA的前体、非编码RNA、siRNA和shRNA。温度敏感性RNA在允许温度(例如,32℃)下起作用并且在非允许温度(例如,37℃)下不起作用或显示低功能。通过系统地将RNA分子的核苷酸改变为热稳定性较差的变体(例如,G→A)同时确保维持RNA的功能特性,将温度敏感性RNA工程化。此外,由温度转变诱导的核苷酸对的热稳定性差异改变了RNA的二级结构。

实施例7:用温度敏感性药剂离体处理细胞

[0150] 本实施例说明了一种用于将RNA或蛋白质离体瞬时递送至细胞的方法(图13)。温度敏感性治疗剂可以是本文公开的任何温度敏感性治疗剂。ts药剂如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。将用ts药剂处理的靶细胞在允许温度下离体培养特定的持续时间(例如3天),然后在非允许温度下培养特定的持续时间(例如10天)。GOI的RNA(或从RNA翻译的蛋白质)的水平在允许温度下增加并达到高水平。在转换至非允许温度后,预期的RNA水平逐渐降低,随后达到非表达水平(图13)。

实施例8:温度敏感性药剂的离体治疗用途

[0151] 本实施例说明了一种用于将RNA或蛋白质离体瞬时递送至细胞的方法(图14和图15)。ts药剂如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃:人体温)下不起作用。通常,靶细胞取自患者(自体细胞移植物;图14),但也可以使用从供体分离的靶细胞(同种异体细胞移植物;图15)。例如,可通过使用抗体缀合的磁珠来分离靶细胞。将靶细胞与ts药剂在允许温度例如33℃下离体孵育特定的持续时间,例如24小时。GOI的RNA(或从RNA翻译的蛋白质)的水平在允许温度下增加,达到高水平。在诱导治疗效果后,将细胞移植回患者以治疗患者。温度敏感性治疗剂的活性在受试者的正常体温下不被诱导(即正常体温是非允许温度)。温度敏感性治疗剂的降解在诱导治疗效果之后开始,并且最终温度敏感性治疗剂完全降解。在患者的一生中,体温维持在37℃或更高温度,因此,ts药剂不被重新激活,并且除靶细胞之外的细胞将不会被ts药剂处理。

动员的人外周血细胞

[0152] 将从患者或供体的骨髓或外周血分离的人血细胞在允许温度下用ts药剂离体处理。在注射G-CSF或其他动员剂后,通过单采术机器(例如,COBE Spectra)从外周血收集人白细胞。从骨髓动员后收集的白细胞含有粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、树突细胞、间充质干细胞(MSC)、血管内皮细胞(VEC)和CD34+造血细胞/祖细胞。理想地,使用功能封闭系统如Miltenyi的CliniMacs Prodigy,在功能性温度(例如,33℃)下将这些细胞用ts药剂离体处理特定的持续时间(数小时至数周)。随后,在非允许温度(37℃)下将处理的细胞输注到患者中。ts药剂、含有ts药剂的细胞或ts药剂的产物在患者体内不起作用。

人CD34+造血干细胞/祖细胞

[0153] 通过抗体(抗CD34)缀合的磁珠从动员的人外周血细胞或骨髓细胞分离人CD34+造血干细胞/祖细胞,并将其用作靶细胞,在允许温度下用ts药剂离体处理。在用ts药剂处理后,将人CD34+细胞输注到患者体内并植入到患者的骨髓中。这些细胞将最终在患者体内产生所有血细胞,因此是多种疾病的合适靶标。

包括组织干细胞在内的任何人细胞

[0154] 将从患者或供体分离并用作靶细胞的任何人细胞在允许温度下用ts药剂离体处理。这些细胞包括但不限于皮肤成纤维细胞、滤泡细胞、骨骼肌细胞、肝细胞和神经组织。这些细胞还包括各种组织干细胞,例如间充质干细胞、神经干细胞、肌肉干细胞、皮肤干细胞和肠干细胞。

实施例9:温度敏感性药剂的半体内治疗用途

[0155] 本实施例描述了将RNA或蛋白质瞬时递送至细胞的半体内方法(图16)。温度敏感性治疗剂可以是本文公开的任何温度敏感性治疗剂。ts药剂在允许温度(例如33℃)下起作

用,但在非允许温度(例如37℃)下不起作用。

[0156] 患者经历治疗性低体温的程序:患者的核心体温维持在低于正常体温的温度(例如,33℃)下。用ts药剂离体处理靶细胞(任何自体的或同种异体的细胞)并立即输注到患者的循环中或注射到患者的器官中。

[0157] 当患者在目标温度(例如33℃)下维持特定的持续时间(例如24小时)时,ts药剂展现出其预期功能。GOI的RNA(或从RNA翻译的蛋白质)的水平在允许温度下增加,达到高水平。随后,患者体温返回到37℃的正常温度。ts药剂在患者体内37℃的非允许条件下不再起作用。在患者的一生中,体温维持在37℃或更高温度,因此,ts药剂不被重新激活,并且除靶细胞之外的细胞将不会被ts药剂处理。值得注意的是,该治疗程序可应用于任何细胞类型,包括上述那些。

实施例10:温度敏感性药剂的体内治疗用途

[0158] 本实施例说明了如何将温度敏感性病毒载体施用至受试者,并且当在受试者中诱导温和和低体温时被瞬时激活(图17)。温度敏感性治疗剂可以是本文公开的任何温度敏感性治疗剂。温度敏感性治疗剂在允许温度(例如33℃)下起作用,但在非允许温度(例如37℃:人体温)下不起作用。

[0159] 使用目标温度管理(TTM)程序降低受试者的体温,该程序已在临床中用于心脑血管创伤患者(Callaway等人,2015)。TTM程序被设计为实现并维持受试者体内的特定体温一段时间。此类程序先前已在治疗上用于减少各种急性健康问题(例如心脏病发作和中风)引起的负面影响。使用TTM程序的设备和一般方法是本领域已知的并且可以用于本文所述的方法中。TTM程序可以使用多种方法进行,包括冷却导管、冷却毯和在身体周围施加冰块。多种器械已用于此目的。例如,ArcticSun™是可用于将患者体温降低或升高至32℃-38.5℃的器械(Pittl等人,2013)。所述程序可安全进行,并且据报道,该器械没有造成重大不利影响。

[0160] 使用TTM程序将患者置于低体温条件下,并且目标体温是足以诱导温度敏感性治疗剂的活性的温度。温度敏感性治疗剂通过全身途径(例如静脉内)或通过直接注射到器官/组织中(例如导管或经皮针头注射)直接递送至患者(图17)。

[0161] 将患者的温度在允许温度下保持一定的时间,所述时间足以允许诱导温度敏感性治疗剂的期望活性。温度敏感性药剂的期望活性在含有或暴露于温度敏感性治疗剂的细胞中产生治疗效果。

[0162] 在实现期望的治疗效果之后,患者的体温随后返回到正常体温(即,非允许温度),导致温度敏感性治疗剂的活性停止。随后是温度敏感性治疗剂的降解。

通过循环的全身递送

[0163] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。一旦患者的核心体温稳定地维持在目标温度,就将ts药剂直接静脉内递送至患者。通过该全身途径将ts药剂递送至许多器官和组织。患者的核心体温在功能性温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的体温保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。

[0164] ts药剂可以是裸RNA(即合成RNA)。在具有或不具有靶器官特异性的情况下通过循环的全身递送将裸RNA递送至许多器官。可替代地,ts药剂是由纳米颗粒包封的RNA(即合成RNA),所述纳米颗粒被工程化以靶向特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。因

此,通过循环的全身递送将纳米颗粒包封的RNA递送至特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。可替代地,ts药剂是包装在病毒颗粒中的RNA。根据包膜类型和其他特征,病毒颗粒靶向特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。因此,通过循环的全身递送将包装在病毒颗粒中的RNA递送至特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。可替代地,ts药剂是温度敏感性病毒载体。根据包膜类型和其他特征,病毒颗粒靶向特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。因此,通过循环的全身递送将温度敏感性病毒载体递送至特定细胞类型、组织、器官、癌症、肿瘤或异常细胞。

通过脑脊液靶向递送至脑和脊髓

[0165] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。当患者的核心体温稳定地维持在目标温度下时,通过硬膜外注射将ts药剂直接递送至患者的脑脊液。将ts药剂递送至脑和脊髓。患者的核心体温继续维持在允许温度下一段期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的体温保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。

通过经皮注射靶向递送至肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺、骨髓和其他器官

[0166] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。当患者的核心体温稳定地维持在目标温度下时,在超声或CT的视觉引导下,使用非常细的针头将ts药剂通过皮肤(经皮)注射到器官例如肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺或其他器官中。患者的核心体温在允许温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的体温保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。

使用注射针头导管通过内窥镜检查靶向递送至肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺、骨髓和其他器官

[0167] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。一旦患者的核心体温稳定地维持在目标温度下,则通过内窥镜注射针头导管将ts药剂直接递送至特定器官和组织。患者的核心体温在允许温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的体温保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。

通过血管导管靶向递送至肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、胰腺、骨髓和其他器官

[0168] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。但患者的核心体温稳定地维持在目标温度下时,通过血管导管将ts药剂直接递送至特定器官和组织。患者的核心体温在允许温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的体温保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非功能性温度,药剂停止起作用。

通过吸入靶向递送至肺和其他器官

[0169] 将患者置于低体温条件下(例如33℃)。当患者的核心体温稳定地维持在目标温度下时,通过吸入将ts药剂直接静脉内递送至患者。通过经肺吸入将ts药剂递送至肺和其他器官。患者的核心体温在允许温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的温度保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常的37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。

靶向递送至动员至脾脏的骨髓细胞

[0170] 患者将接受G-CSF、普乐沙福或其他细胞因子的注射以将骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞和内皮干细胞)动员至受试者的脾脏。将患者置于低体温条件下(例如33℃)。当患者的核心体温稳定地维持在目标温度下时,通过上述方法将ts药剂递送至脾脏。随后,将ts药剂递送至动员至脾脏的骨髓细胞。患者的核心体温在允许温度下维持期望的持续时间(例如,24小时)。当患者的温度保持在药剂的允许温度(例如,在33℃)下时,药剂起作用。当患者体温返回到正常温度37℃时,即药剂的非允许温度,药剂停止起作用。例如,所述方法可包括将治疗有效量的温度敏感性药剂(例如,温度敏感性治疗剂)施用至脾脏中的一个或多个骨髓细胞(包括但不限于CD34+细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞)。

实施例11:通过作为温度敏感性药剂的自我复制RNA将人ES和iPS细胞分化成期望的细胞类型

[0171] 本实施例描述了如下发现,即表达人转录因子的温度敏感性自我复制RNA可将hPSC分化成各种分化细胞。本实施例中提供的发现可应用于“用ts药剂离体处理细胞”。通过该方法产生的分化细胞具有许多有用的应用,如通过使用患者来源的iPS细胞进行人疾病的体外建模和药物筛选。本实施例中提供的发现可应用于“ts药剂的离体治疗用途”。可将在该方法中产生的分化细胞移植以修复患者中的有缺陷的器官和组织。例如,将通过该方法离体产生的神经元(更具体地,多巴胺能神经元)移植到患者的黑质(脑的一部分)以治疗帕金森病。本实施例中提供的发现可用于“ts药剂的半体内治疗用途”。将用诱导神经元的ts药剂处理的细胞移植到经历治疗性低体温的患者中,使得ts诱导的细胞分化在患者体内发生。在分化的细胞出现后,通过使患者的体温返回非允许温度(即37℃)来关闭ts药剂。本实施例中提供的发现可应用于“ts药剂的体内治疗用途”。例如,将表达一组转录因子的ts药剂直接注射到经历治疗性低体温(在允许温度下)的糖尿病患者的胰腺中,使得患者的胰管细胞在体内转化为分泌胰岛素的β细胞。在期望的细胞出现后,通过将患者的体温返回非允许温度(即,37℃)来关闭ts药剂。

材料和方法

细胞培养

[0172] 人脂肪干细胞来源的iPS细胞系(ADSC-iPS细胞)购自System Biosciences(加利福尼亚州帕洛阿尔托)。根据标准的hPSC培养方法,细胞常规地被维持为未分化的多能细胞。简言之,在补充有100ng/ml FGF2的StemFit basic02(Ajinomoto,日本)中培养细胞。此外,在包被有层粘连蛋白-511底物(iMatrix-511,Nippi,日本)的细胞培养皿上培养细胞。

温度敏感性自我复制RNA(srRNA1ts2)

[0173] 将目的基因(GOI)的开放阅读框克隆到srRNA1ts2载体中,以便以温度敏感的方式控制GOI的表达。根据Yoshioka等人,2013,通过载体的体外转录产生合成RNA,并将其用于转染。将以下GOI克隆到srRNA1ts2载体中:

srRNA1ts2-NGN3:人神经元素3(NGN3) [NCBI GeneID:50674];以及

srRNA1ts2-ETV2:人ETS变体2(ETV2) [NCBI GeneID:2116]。

结果

神经元的生成

[0174] 将ADSC-iPSC细胞以 1.2×10^5 个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。在铺板细胞之

前,用Rock抑制剂预处理细胞1小时。铺板后24小时,用srRNA1ts2-NGN3转染细胞。对于转染,用与1 μ l JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的0.5 μ g合成RNA(srRNA) 处理24孔板的每个孔,最终体积为50 μ l。向细胞中添加转染复合物后,添加450 μ l培养基。将细胞在33 $^{\circ}$ C下孵育72小时。然后将细胞传代并在鸟氨酸/层粘连蛋白包被的玻璃盖玻片上培养。然后在37 $^{\circ}$ C下培养细胞。每天更换培养基。srRNA1ts2-NGN3载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶(pac)选择基因,因此,可以使用嘌呤霉素进行选择。传代后,将细胞在存在1 μ g/ml嘌呤霉素的情况下培养24小时。在第0、1、2、3、4、5和6天拍摄相对比图像(图18)。为了更清楚地显示形成的神经突,还显示了第6天图像的放大图。在第9天,将细胞固定并用抗微管蛋白 β III(TUBB3)(一种神经标记)的抗体染色。显示了两种不同放大倍数(10x、40x)的荧光显微图像(图18)。结果表明,srRNA1ts2-NGN3可快速有效地将人iPS细胞分化为神经元。

血管内皮细胞的产生

[0175] 将ADSC-iPSC细胞以 1.2×10^5 个细胞/孔的密度铺板在24孔板上。在铺板细胞之前,用Rock抑制剂预处理细胞1小时。铺板后24小时,用srRNA1ts2-ETV2转染细胞。对于转染,用与1 μ l JetMessenger (Polyplus) 转染试剂混合的0.5 μ g合成RNA(srRNA) 处理24孔板的每个孔,最终体积为50 μ l。向细胞中添加转染复合物后,添加450 μ l培养基。将细胞在32 $^{\circ}$ C下孵育3天,然后在37 $^{\circ}$ C下再培养5天(总共8天)。每天更换培养基。srRNA1ts2-ETV2载体含有在“IRES”序列后插入的嘌呤霉素N-乙酰转移酶(pac)选择基因,因此,可以使用嘌呤霉素进行选择。在温度从33 $^{\circ}$ C转换至37 $^{\circ}$ C时,向培养物中添加1 μ g/ml嘌呤霉素。第二天,将培养基替换为含有1 μ g/ml嘌呤霉素的培养基。因此,细胞在1 μ g/ml嘌呤霉素存在下培养2天。在第1、2、3、4、5、6、7和8天拍摄相对比图像(图19)。在第8天,将细胞固定并用抗CD31(血管内皮细胞的标记)的抗体染色。显示了两种不同放大倍数(10x、20x)的荧光显微图像(图19)。结果表明,srRNA1ts2-ETV2可快速有效地将人iPS细胞分化为血管内皮细胞。

实施例12:基因组编辑

[0176] 基因组编辑是通过替换、缺失或添加核苷酸序列来改变生物体基因组的基因工程化方法。已提出,基因组编辑可用于校正基因组突变来进行基因疗法。第一步,基因组DNA必须在特定位置被DNA核酸酶切割,例如锌指核酸酶(ZFN)、基于转录激活物样效应物的核酸酶(TALEN)或成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-CAS9系统。这些核酸酶的引入必须小心控制,因为由这些酶引入的双链DNA断裂对细胞是高度有害的。这些核酸酶的靶向表达需要精确控制时间和持续时间。据报道,指导RNA和CAS9均可在单个仙台病毒载体上编码,这使得可以高效递送这些组分以用于人细胞的基因组编辑(Park等人,Molecular Therapy 2016)。然而,CAS9的持续表达可导致在人细胞中引入不可控制的DNA断裂和突变。因此,为了在治疗上使用基因编辑系统,期望CAS9表达持续短时间,约数小时而不是数天。为此,温度敏感性药剂可用作这些组分、尤其是核酸酶的递送媒介物。

[0177] 首先,用于报道的CRISPR/CAS9系统(Park等人,2016)的仙台病毒载体被温度敏感性仙台病毒载体(SeVts-CAS9-指导RNA)替换。在一个实施方案中,SeVts是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。将人原代成纤维细胞在33 $^{\circ}$ C下以MOI 25用温度敏感性仙台病毒载体感染,并在33 $^{\circ}$ C在CO₂培养箱中维持24-48小时。随后,将细胞培养物的温度转变至37 $^{\circ}$ C以进行其余的细胞培养。病毒复制和增加的CAS9表达仅在细胞培养物维持在33 $^{\circ}$ C下时发生,

因此,细胞暴露于CAS9核酸酶限于这种短时间。当细胞在37℃下培养时,温度敏感性仙台病毒载体最终从细胞中丢失,因此,无需担心CAS9表达在体外和体内的重新激活。类似地,温度敏感性自我复制RNA如srRNA1ts2(srRNA1ts2-CAS9-指导RNA)可用于代替SeVts-CAS9-指导RNA。

实施例13:CAR T细胞疗法

[0178] CAR T细胞疗法使用了将编码嵌合抗原受体(CAR)的载体转移到患者自身的T细胞中并在细胞毒性T细胞中稳定表达CAR(Maus和June 2016)。CAR T细胞疗法旨在重新编程患者自身的T细胞以攻击患者的恶性细胞。例如,靶向CD19的CAR T细胞已经成功地应用于B细胞恶性肿瘤。然而,CD19也在正常B细胞中表达,因此,CAR的持续表达可能引起副作用,并且是不希望的。因此,最近的临床试验将编码CAR的合成mRNA转移到患者自身的T细胞中,使得CAR的表达是瞬时的(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT02624258)。然而,合成mRNA的短更新时间(<12小时)和相对低的蛋白质表达水平在实现CAR的足够表达水平方面存在问题。为了解决这个问题,将ts药剂用作CAR向T细胞的递送媒介物。

温度敏感性药剂将CAR递送至T细胞的离体治疗用途

[0179] 使用单采术机器(COBE Spectra)和基于磁珠的富集方法(Miltenyi的CliniMacs Prodigy)从外周血收集T细胞。然后,用srRNA1ts2-CAR转染T细胞并在允许温度(33℃)下离体培养24小时(或更长时间)。理想地,该程序在功能封闭系统如Miltenyi的CliniMacs Prodigy中执行。随后,将处理的细胞输注回患者。在非允许温度(37℃)下的患者体内,srRNA1ts2-CAR停止产生CAR,但T细胞表面上已经存在足够量的CAR,其发挥CAR的预期功能。可替代地,使用编码CAR(SeVts-CAR)的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-CAR。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于将CAR递送至T细胞的半体内治疗用途

[0180] 将用srRNA1ts2-CAR处理的T细胞立即输注到通过治疗性低体温维持在允许温度(例如,33℃)下的患者中。在维持允许温度时,srRNA1ts2-CAR起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37℃)时,srRNA1ts2-CAR停止产生CAR。可替代地,可以使用编码CAR(SeVts-CAR)的温度敏感性仙台病毒载体。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于将CAR递送至T细胞的体内治疗用途

[0181] srRNA1ts2-CAR通过体内递送至维持在允许温度(33℃)下的患者体内而直接靶向T细胞。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-CAR起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37℃)时,srRNA1ts2-CAR停止产生CAR。可替代地,可以使用编码CAR(SeVts-CAR)的温度敏感性仙台病毒载体。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

实施例14:PD1和CTLA4的显性负性突变体

[0182] 已知程序性死亡1(PD1)和细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)用作免疫检查点。抗PD1和CTLA4的抗体(例如,纳武单抗和派姆单抗)的全身递送已用于癌症疗法。然而,多达20%的接受这些疗法的患者经历不良事件,如自身免疫(Roberts等人,2017)。因为免疫检查点天然地用于限制免疫功能激活以防止自身免疫,所以通过施用抗体全身性阻断这些分子的功能被认为不仅激活了针对癌症的免疫,还激活了针对患者自身正常细胞的免疫。为了解决这个问题,PD1和CTLA1的显性负性突变体在T细胞中特异性表达,从而仅在T细胞中

阻断PD1和CTLA4的功能(Shin等人,2016)。对于PD1,已显示含有胞外结构域和跨膜结构域但缺乏细胞质结构域的突变体作为显性负性突变体(PD1诱饵或PD1 Δ)起作用(Shin等人,2016)。尽管在小鼠研究中使用逆转录病毒载体将PD1诱饵递送至分离的T细胞,但考虑到长期阻断免疫检查点的潜在不利影响,将逆转录病毒载体整合到宿主基因组中和PD1诱饵的持续表达对于人是不期望的。理想地,PD1诱饵在T细胞(或其他免疫细胞)中的表达应在发挥其有益功能后被永久关闭。为此,将ts药剂用作PD1和CTLA4的显性负性突变体的递送媒介物。

温度敏感性药剂用于递送显性负性PD1突变体的离体治疗用途

[0183] 使用单采术机器(COBE Spectra)和基于磁珠的富集方法(Miltenyi的CliniMacs Prodigy)从外周血收集靶细胞(例如T细胞)。然后,用srRNA1ts2-PD1 Δ 转染靶细胞,并在允许温度(例如,33℃)下培养期望的时间量(例如,24小时或1周)。随后,将处理的细胞输注到患者中。在非允许温度(37℃)下的患者体内,srRNA1ts2-PD1 Δ 将最终停止产生PD1 Δ 。然而,只要PD1 Δ 蛋白存在于靶细胞中,PD1功能就被阻断。可替代地,可以使用编码PD1 Δ 的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ 。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于递送显性负性PD1突变体的半体内治疗用途

[0184] 将用srRNA1ts2-PD1 Δ 处理的T细胞立即输注到通过治疗性低体温维持在允许温度(例如,33℃)的患者中。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-PD1 Δ 起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37℃)时,srRNA1ts2-PD1 Δ 停止产生PD1 Δ 。可替代地,可以使用编码PD1 Δ 的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ 。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于递送显性负性PD1突变体的体内治疗用途

[0185] srRNA1ts2-PD1 Δ 通过体内递送至维持在允许温度(33℃)下的患者体内而直接靶向T细胞。在维持允许温度时,srRNA1ts2-PD1 Δ 起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37℃)时,srRNA1ts2-PD1 Δ 停止产生PD1 Δ 。可替代地,可以使用编码PD1 Δ 的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ 。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

实施例15:CAR T细胞和PD1和CTLA4的显性负性突变体的组合法

[0186] 全身性施用PD1阻断抗体增强通过CAR T细胞对肿瘤根除(John等人,2013)。ts药剂(特别是srRNA1ts2)向同一T细胞提供对于PD1阻断功能和CAR的递送媒介物,因为srRNA1ts2具有大的货物容量并且可以在同一载体中容纳多个基因。

温度敏感性药剂用于将CAR和显性负性PD1递送至T细胞的离体治疗用途

[0187] PD1 Δ 和CAR的编码区与在它们之间插入的P2A肽(自切割肽)融合。该融合蛋白编码序列现在作为GOI插入到srRNA1ts2载体中。从srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR载体产生合成RNA(srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR)。使用单采术机器(COBE Spectra)和基于磁珠的富集方法(Miltenyi的CliniMacs Prodigy)从外周血收集T细胞。然后,用srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR转染T细胞并在允许温度(33℃)下培养24小时(或更长时间)。随后,将处理的细胞输注回患者。在非允许温度(37℃)下的患者体内,srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR停止产生PD1 Δ 和CAR。然而,足够量的PD1 Δ 和CAR已经存在于T细胞的表面上。可替代地,可以使用编码PD1 Δ -CAR的温度

敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F (Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于将CAR和显性负性PD1递送至T细胞的半体内治疗用途

[0188] 将用srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR处理的T细胞立即输注到通过治疗性低体温维持在允许温度(例如,33°C)下的患者中。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37°C)时,srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR停止产生CAR和PD1 Δ 。可替代地,可以使用编码PD1 Δ -CAR的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F (Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于将CAR和显性负性PD1递送至T细胞的体内治疗用途

[0189] srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR通过体内递送至维持在允许温度(33°C)下的患者体内而直接靶向T细胞。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37°C)时,srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR停止产生CAR和PD1 Δ 。可替代地,可以使用编码PD1 Δ -CAR的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-PD1 Δ -CAR。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F (Ban等人,PNAS 2011)。

实施例16:核糖核蛋白

[0190] 核糖核蛋白通过与RNA形成复合物而起作用。核糖核蛋白的治疗应用具有挑战性,因为难以从同一载体同时表达蛋白质和RNA。例如,端粒酶的主要组分是人端粒酶逆转录酶(TERT)和端粒酶RNA(TERC)。端粒的异常缩短引起疾病。因此,递送端粒酶(TERT+TERC)以延长端粒是一种理想的治疗干预。然而,端粒酶的持续存在可引起不良事件如肿瘤形成。因此,期望TERT和TERC的递送具有时间限制。为此,ts药剂可用作TERT和TERC的递送媒介物。

温度敏感性药剂用于递送TERT和TERC的离体治疗用途

[0191] 构建srRNA1ts2载体以温度敏感的方式表达蛋白TERT。载体还含有被自切割核酶(例如锤头状核酶)夹在中间的TERC,RNA组分。所得载体用于产生合成RNA(srRNA1ts2-TERT-TERC)。用srRNA1ts2-TERT-TERC转染靶细胞(例如造血干细胞)。在允许温度(例如,33°C)下,srRNA1ts2-TERT-TERC复制并产生TERT(蛋白质)。同时,一些RNA分子(srRNA1ts2-TERT-TERC)被核酶自切割并变成TERC(RNA)。然后,TERT和TERC形成端粒酶复合物并延伸端粒。然后将靶细胞(例如造血干细胞)输注到患者的循环中。在37°C的非允许温度下,srRNA1ts2-TERT-TERC停止起作用。可替代地,可以使用编码TERT-TERC的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-TERT-TERC。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F (Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于递送TERT和TERC的半体内治疗用途

[0192] 将用srRNA1ts2-TERT-TERC处理的靶细胞立即移植到通过治疗性低体温维持在允许温度(例如,33°C)下的患者中。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-TERT-TERC起作用。然而,当患者的温度转换至正常温度(37°C)时,srRNA1ts2-TERT-TERC停止产生TERT和TERC。可替代地,可以使用编码TERT-TERC的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-TERT-TERC。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F (Ban等人,PNAS 2011)。

温度敏感性药剂用于递送TERT和TERC的体内治疗用途

[0193] srRNA1ts2-TERT-TERC通过体内递送至维持在允许温度(33°C)下的患者体内而直接靶向细胞。当维持在允许温度下时,srRNA1ts2-TERT-TERC起作用。然而,当患者的温度转

换至正常温度(37℃)时,srRNA1ts2-TERT-TERC停止产生TERT和TERC。可替代地,可以使用编码TERT-TERC的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-TERT-TERC。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

实施例17:基因敲低或沉默

[0194] RNAi(包括微小RNA、siRNA和shRNA)已成为出于治疗目的用于敲低特定基因的功能的有吸引力的选择(Kaczmarek等人,2017)。然而,RNAi技术的缺点是它的作用时间非常短,其需要重复给药大量siRNA。另一方面,尽管质粒和病毒可以提供从Pol III启动子的shRNA强烈表达,但是在需要时难以停止表达。此外,基于DNA的shRNA表达系统可以整合到生物体的基因组中并引起突变。在这个意义上,温度敏感性srRNA或仙台病毒载体可以提供理想的解决方案,因为它们提供RNAi的无足迹(没有整合到生物体的基因组中)可控和延长的表达。

[0195] shRNA。以类似于Park等人,2016中所示的侧翼为自切割核酶的指导RNA的方式,将shRNA作为侧翼为自切割核酶的GOI并入srRNA1ts2或SeVts中。将srRNA1ts2-shRNA递送至靶细胞,当靶细胞维持在允许温度下时,靶基因是沉默的。然而,当温度转变至非允许温度时,shRNA的产生停止,并且靶基因是非沉默的。可替代地,可以使用编码shRNA的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-shRNA。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

[0196] dsRNA。长双链RNA(dsRNA)的表达单元通过用短接头RNA序列连接靶RNA的长有义链和其反义链(即,待敲低的)来制备。以类似于侧翼为自切割核酶的指导RNA的方式(Park等人,2016和Shinagawa T1,Ishii S.2003),将dsRNA的该表达单元作为侧翼为自切割核酶的GOI插入srRNA1ts2载体中。为了促进从dsRNA形成siRNA,srRNA1ts2载体还表达人DICER1(NCBI参考序列:NG_016311.1)。将srRNA1ts2-dsRNA或srRNA1ts2-DICER1-dsRNA递送至靶细胞,当靶细胞维持在允许温度下时,靶基因是沉默的。然而,当温度转变至非允许温度时,dsRNA(和DICER1,如果存在的话)的产生停止,并且靶基因是非沉默的。可替代地,可以使用编码dsRNA或dsRNA-DICER1的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-dsRNA或srRNA1ts2-dsRNA-DICER1。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

[0197] asRNA。以类似于Park等人,2016和Shinagawa T1,Ishii S.2003中所示的侧翼为自切割核酶的指导RNA的方式,将靶RNA的反义链(asRNA)(即,待敲低的)作为侧翼为自切割核酶的GOI插入srRNA1ts2载体中。为了促进从dsRNA形成siRNA,srRNA1ts2载体还表达人DICER1(NCBI参考序列:NG_016311.1)。将srRNA1ts2-asRNA或srRNA1ts2-DICER1-asRNA递送至靶细胞,当靶细胞维持在允许温度下时,靶基因是沉默的。然而,当温度转变至非允许温度时,sRNA(和DICER1,如果存在的话)的产生停止,并且靶基因是非沉默的。可替代地,可以使用编码asRNA或asRNA-DICER1的温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts2-asRNA或srRNA1ts2-asRNA-DICER1。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

[0198] 上文详述的基因敲低或基因沉默方法适用于“用ts药剂离体处理细胞”、“ts药剂的离体治疗用途”、“ts药剂的半体内治疗用途”或“ts药剂的体内治疗用途”中的任一种。

实施例18:细胞融合疗法

[0199] 再生医学领域的策略之一是将人多能干细胞如胚胎干(ES)细胞和诱导多能干(iPS)细胞分化成期望的细胞类型如神经元和肌肉,然后将这些分化的细胞移植到患者中。

通常,期望使用由患者自身细胞如血细胞或成纤维细胞制备的iPS细胞。例如,为了治疗患有肌营养不良的患者,可以将从ES细胞或iPS细胞离体分化的骨骼肌细胞移植到患者的骨骼肌中。技术挑战之一是确保外源性肌细胞的适当植入和患者缺陷性肌肉功能的替代或补充。为了解决这个问题,可以将编码融合蛋白的RNA递送至外源性肌细胞中,从而促进了外源性肌细胞和患者自身肌细胞之间的细胞间融合。

温度敏感性药剂用于递送融合蛋白的半体内治疗用途

[0200] 构建srRNA1ts2载体以表达融合蛋白如仙台病毒F和HN蛋白。F和HN通过P2A自切割肽融合成单个蛋白质。srRNA1ts2-F-HN载体用于产生合成RNA(srRNA1ts2-F-HN)。已充分确定细胞表面上F和HN蛋白的存在可诱导细胞融合(Rawling等人,2008)。可替代地,将可单独诱导细胞间融合(Rawling等人,2008)的人呼吸道合胞病毒F蛋白克隆到srRNA载体中以产生合成RNA(srRNA1ts2-RSVF)。融合蛋白的另一个例子是Myomaker(Mymk)和Myomixer(Mymx)(也称为Myomerge)(Bi等人,2017)。Myomaker和myomixer通过P2A自切割肽融合成单个蛋白质。srRNA1ts2-Mymk-Mymx载体用于产生合成RNA(srRNA1ts2-Mymk-Mymx)。Myomaker和Myomixer的存在不仅诱导肌肉的细胞间融合,而且还诱导成纤维细胞的细胞间融合(Bi等人,2017)。使用上述方法将人iPS细胞分化成骨骼肌。然后用srRNA1ts2-HN-F或srRNA1ts2-RSVF或srRNA1ts2-Mymk-Mymx转染骨骼肌,然后立即注射到患者的骨骼肌中,所述患者的体温已经通过治疗性低体温程序降低至33°C(图15)。当患者在目标温度(33°C)下维持24小时时,融合蛋白在移植的骨骼肌细胞中表达,然后其融合至患者自身的缺陷性骨骼肌细胞。随后,患者体温返回至37°C的正常温度。ts药剂和融合蛋白在患者体内的37°C的这个非功能性条件下不再起作用。

[0201] 可通过这种半体内使用ts药剂处理的组织不限于骨骼肌。心肌细胞和肝细胞通常是多倍体的,因此,心脏组织和肝脏是这种疗法的合适靶标。心肌细胞和肝细胞是可以容易地从人ES/iPS细胞产生的组织。此外,ts药剂的半体内使用可用于治疗神经疾病如脊髓损伤和神经退行性疾病如帕金森病。可替代地,可以使用温度敏感性仙台病毒载体代替srRNA1ts。例如,SeVts可以是SeV18/TS15 Δ F(Ban等人,PNAS 2011)。

[0202] 上文详述的基因敲低或基因沉默方法可适用于“用ts药剂离体处理细胞”、“ts药剂的离体治疗用途”、“ts药剂的半体内治疗用途”或“ts药剂的体内治疗用途”中的任一种。

实施例19:疫苗

[0203] 温度敏感性药剂(ts药剂)如srRNA或仙台病毒载体在允许温度(例如,约31°C-34°C)下起作用,但在非允许温度(例如, $\geq 37^\circ\text{C}$)下不起作用。人受试者的核心体温为约37°C,而人受试者的表面体温为约31°C-34°C。因此,施用至人患者身体表面处或附近的细胞(例如,皮内、皮下或肌肉内施用)的ts药剂在不降低人患者的核心体温的情况下起作用(图20)。无需采取进一步措施。

[0204] 类似地,人受试者的鼻腔和上气管的温度为约32°C,并且人受试者的亚段支气管的温度为约35°C(McFadden等人,1985)。因此,鼻内施用至人患者的上呼吸道(鼻腔、咽部和/或喉部)和/或上气管的细胞的ts药剂在不降低人患者的核心体温的情况下起作用(图22)。鼻内施用可以通过吹入、吸入或滴注进行。无需采取进一步措施。

[0205] 可替代地,随后可通过升高人患者的表面体温,例如通过将热贴片或加热垫施用至患者皮肤的治疗区域,浸泡在温浴中或坐在热桑拿浴中,使施用至人患者身体表面处或

附近的细胞(例如,皮内、皮下或肌内施用)的ts药剂不起作用。该治疗程序是非常安全的,因为ts药剂仅在预期区域起作用,而在患者身体的其他区域不起作用。类似地,可通过将人患者置于具有非允许温度(例如, $\geq 37^{\circ}\text{C}$)的环境中而使鼻内施用至人患者的上呼吸道(鼻腔、咽部和/或喉部)和/或上气管的细胞的ts药剂不起作用。

[0206] 使用srRNA1ts2作为载体的免疫原性组合物和疫苗适于诱导针对所有类型病原体的免疫应答。例如,一旦已知病原体抗原的编码区,就可以相对快速地构建重组srRNA1ts2载体。另外,srRNA1ts2载体的RNA可以在体外转录而不使用动物或人来源的材料。以这种方式,使用srRNA1ts2载体的疫苗容易适于使用当前良好生产实践的生产。可替代地,可以使用编码病原体抗原的温度敏感性仙台病毒载体(例如SeV18/TS15 Δ F)。

[0207] srRNA1ts2的构建如以上实施例3中所述。简言之,srRNA1ts2包含缺乏VEEV结构蛋白编码区的委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)复制子。VEEV复制子包含VEEV非结构蛋白编码区,其中插入15-18个核苷酸,导致在nsP2的 β 片层5与 β 片层6之间包含5或6个另外的氨基酸(SEQ ID NO:39=TGAAA)的非结构蛋白2(nsP2=解旋酶蛋白酶)的表达。所述另外的氨基酸导致自我复制RNA的温度敏感性。

[0208] 编码严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2,也称为2019-nCoV)的刺突蛋白(或其部分)的示例性srRNA1ts2载体的基因组如图21所示。相关冠状病毒的刺突蛋白和刺突蛋白的受体结合结构域(RBD)先前被鉴定为疫苗和药物开发的靶标(Du等人,Nat Rev Microbiol,7:226-236,2009)。2019-nCoV的RNA基因组的序列阐述于NCBI登录号:NC_045512。构建了3个不同的温度敏感性srRNA1ts2载体。srRNA1ts2-2019-nCoV-刺突编码全长刺突蛋白。srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1编码与刺突蛋白的RBD融合的CD5信号肽。srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2编码与刺突蛋白的RBD、跨膜结构域和胞质尾融合的刺突蛋白的信号肽。刺突蛋白或其片段的表达由VEEV复制子的26S启动子驱动。

[0209] 使用T7 RNA聚合酶体外转录整个RNA。然后,将RNA转染到受试者皮肤组织的细胞中。转染的合适方法是通过裸RNA的贴片电穿孔。可替代地,使用微针皮内转染RNA。例如,使用由透明质酸或壳聚糖-透明质酸复合物制成的可溶解微针皮内转染RNA。在一些实施方案中,可使用常规Mantoux程序。可替代地,可使用设计成促进皮内注射的特定注射装置。

[0210] srRNA1ts2-2019-nCoV-刺突的刺突蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示:

```
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS  
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLI  
NNATNVVIVKCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLE  
GKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT  
LLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK  
CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKRISN  
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD  
YNYKL PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPC  
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN  
FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITP  
GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAETHVNSY  
ECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTI
```

SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE
VFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDC
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM
QMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALN
TLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPA
ICHGDKAHFPREGVVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDP
LQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL
QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDD

SEPVLGKVKLHYT。信号肽从残基1-15延伸,胞外区从残基16-1213延伸,跨膜结构域从残基1214-1236延伸,并且细胞质结构域从残基1237-1273延伸。

[0211] srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1的刺突蛋白片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示:
MPMGLSLQPLATLYLLGMLVASCLGPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKRISNCVADY
SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL
PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEG
FNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAP。CD5信号肽从残基1-24延伸,并且RBD从残基25-192延伸。

[0212] srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD2的刺突蛋白片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示:
MFVFLVLLPLVSSQCPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKRISNCVADYSVLYNSASF
STFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL PDDFTGCVI
AWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQS
YGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCCLKG
CCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVKLHYT。信号肽从残基1-15延伸,RBD从残基16-207延伸,跨膜结构域从残基208-230延伸,并且细胞质结构域从残基231-267延伸。

[0213] RBD的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示:
PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLND
LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNY
NYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR
VVVLSFELLHAP。

实施例20:注射温度敏感性srRNA后GOI的体内表达

[0214] 如实施例19所述和图20所示,可将温度敏感性药剂(ts药剂)(例如srRNA或仙台病毒载体,其在允许温度(例如,约31-34℃)下起作用,但在非允许温度(例如,37℃)下不起作用)递送至人体表面(例如,皮肤)以用于目的基因(GOI)的受控制的表达。因此,编码GOI的ts药剂具有固有的安全特征,因为GOI的表达限于递送ts药剂的局部区域(允许温度)。也就是说,ts药剂的GOI的无意表达不会发生在自然温度高于或低于允许温度的受试者身体区域中。本实施例表明,该安全特征在哺乳动物受试者模型即小鼠体内起作用。小鼠的皮肤温度与人相似(Mortola 2013),因此将ts药剂皮内递送至小鼠预计可模拟将ts药剂皮内递送至人。

[0215] 将RNA在乳酸林格氏溶液中配制成无脂质纳米颗粒或任何其他转染剂的裸RNA。将

编码萤光素酶 (LUC) 的 RNA (5 μ g) 皮内注射到 CD-1 远交系小鼠的右后肢的单个部位。通过使用生物发光成像系统 AMI HTX (Spectral Instruments Imaging, 亚利桑那州图森) 使萤光素酶活性可视化并对其定量。

[0216] 图23显示了在以下接受者中从第0天(注射日)至第26天的体内萤光素酶活性的时程:来自 TriLink (加利福尼亚州圣迭戈) 的对照 synRNA-LUC; 或温度敏感性 srRNA (srRNA1ts2-LUC)。萤光素酶成像显示皮内注射编码萤光素酶的裸 RNA 导致萤光素酶在体内表达。引人注目的是,由 srRNA1ts2-LUC 驱动的萤光素酶的体内表达由于其自我复制特征而持续近一个月。相比之下,由 synRNA-LUC 驱动的萤光素酶的体内表达仅持续了一周多一点。此外, srRNA1ts2-LUC 接受者中萤光素酶的表达水平由于其自我复制特征比 synRNA-LUC 接受者中萤光素酶的表达水平高 10 至 100 倍。重要的是,在接受者皮肤的未注射区域或接受者的内部器官中没有观察到萤光素酶表达。该观察结果表明温度敏感性 srRNA1ts2-LUC 在非允许条件下不复制且不表达萤光素酶。

实施例21:温度敏感性srRNA疫苗引发的细胞免疫

[0217] 在本实施例中,测量了通过皮内施用表达 SARS CoV-2 的刺突蛋白的受体结合结构域 (RBD) 的温度敏感性 srRNA 引发的分泌细胞因子的脾细胞。将 RNA 在乳酸林格氏溶液中配制成无任何脂质纳米颗粒或任何其他转染剂的裸 RNA。为了评估细胞免疫,对从接受单剂量安慰剂(仅缓冲液)或 5 μ g、25 μ g 或 100 μ g srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA 的 CD-1 远交系小鼠获得的脾细胞进行可定量分泌细胞因子的细胞的数量酶联免疫斑点 (ELISpot) 测定(如实施例19所述)。注射后 12 天分离的脾细胞用覆盖 SARS-CoV-2RBD (PepMix SARS-CoV-2[S-RBD], JPT Peptide Technologies GmbH, 德国柏林) 的 53 个肽的池(具有 11 个氨基酸重叠的 15 聚体)刺激 24 小时。

[0218] 如图24A所示,通过皮内注射施用的 srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1 以剂量依赖性方式诱导针对 SARS-CoV-2RBD 的细胞免疫。作为 1 型 CD4+T 辅助细胞 (Th1 细胞) 和 CD8+ 细胞毒性 T 细胞的特征的 IFN- γ 分泌细胞 (图24A) 优选通过温度敏感性 SARS-CoV-2RBD srRNA 疫苗扩增。相比之下,作为 2 型 CD4+T 辅助细胞 (Th2 细胞) 的特征的 IL4 分泌细胞 (图24B) 没有通过温度敏感性 SARS-CoV-2RBD srRNA 疫苗扩增。总之,结果显示,皮内施用 srRNA1ts2-2019-nCoV-RBD1 引发针对 SARS-CoV-2RBD 的 Th1 显性 (Th1>Th2) 细胞免疫应答,这是针对病毒病原体的疫苗的期望特征。

实施例22:温度敏感性srRNA疫苗引发的体液免疫

[0219] 在本实施例中,测量了通过皮内施用表达 SARS CoV-2 的刺突蛋白的受体结合结构域 (RBD) 的温度敏感性 srRNA 引发的抗体。将 RNA 在乳酸林格氏溶液中配制成无任何脂质纳米颗粒或任何其他转染剂的裸 RNA。CD-1 远交系小鼠组 (N=10) 在第 0 天和第 14 天通过皮内注射接受三种配制品中的一种(黑色三角形):安慰剂(仅缓冲液) (图25A), 5 μ g 温度敏感性 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA (图25B) 或 5 μ g 温度敏感性 srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1 RNA 与 RNA 酶抑制剂 (3 个单位的 RNasin Plus) (Promega, 威斯康星州麦迪逊) 的组合 (图25C)。所有小鼠在第 49 天通过皮内注射接受重组 RBD 蛋白 (Ala319-Phe541, 具有 C 末端 6-His 标签, 登录号 YP_009724390.1:R&D Systems, 明尼苏达州明尼阿波利斯) (空心三角形)。为了评估体液免疫,对在第 -3、14、28、46、56 和 63 天从注射小鼠获得的血清进行酶联免疫吸附测定 (ELISA), 其定量对重组 RBD 蛋白具有特异性的免疫球蛋白 G (IgG) 的量 (由在 OD450 处的测量

值表示)。血清中IgG的量显示为OD450。

[0220] 如图25A-图25C所示,在仅初次免疫和第一次加强免疫后的任何组中没有观察到RBD特异性IgG的增加。然而,当小鼠接受包含重组RBD蛋白的第二次加强免疫时,接受包含srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1的初次免疫和第一次加强免疫的组快速应答,其中RBD特异性IgG增加(图25B-图25C),而安慰剂组未显示RBD特异性IgG的显著增加(图25A)。注射重组RBD蛋白后RBD特异性IgG的快速增加表明,接受包含srRNA1ts2-2019-CoV-RBD1的初次免疫和第一次加强免疫的小鼠维持免疫记忆,并展现出对重组RBD的继发性体液应答。

序列表

<110> 伊利克斯根治疗公司

<120> 核酸和蛋白质向细胞和组织的基于温度的瞬时递送

<130> 69944-20012.40

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> US 62/992,700

<151> 2020-03-20

<150> US 62/955,801

<151> 2019-12-31

<160> 44

<170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 1

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Asn Phe Thr Ala Thr Ile Glu Glu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Gly Arg Thr Gly Asn Phe Thr

1 5 10 15

Ala Thr Ile Glu Glu

20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 3

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro

1 5 10 15

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn Tyr Asp Pro

20

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 5

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Arg Ile Asn Leu Val Pro Val Asn

1 5 10 15

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Leu Arg Pro His Pro Arg Ile Asn

1 5 10 15

Leu Val Pro Val Asn

20

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 7

acactgactg ccaagtaccc tgggaatttc actgccacg 39

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

acactgactg ccaagtaccc tgggtgcggc cggactggga atttcactgc cacg 54

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 9

ggaagagtct atgacatgaa cactggtaca ctgcgcaat 39

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

ggaagagtct atgacatgaa cactggtgcc gccgcaactg gtacactgcg caat 54

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 11

ggtacactgc gcaattatga tccgcgcata aacctagta 39

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

ggtacactgc gcaattatga tccgctgcgg ccccatccgc gcataaacct agta 54

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 13

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Asn Phe Thr Ala Thr

1

5

10

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Thr Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Gly Arg Thr Gly Asn Phe Thr

1 5 10 15

Ala Thr

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 15

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 17

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Arg Ile Asn Leu Val

1 5 10

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Gly Thr Leu Arg Asn Tyr Asp Pro Leu Arg Pro His Pro Arg Ile Asn

1

5

10

15

Leu Val

<210> 19

<211> 240

<212> DNA

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 19

ataggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
tggtttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cagatcctt gacattggaa 240

<210> 20

<211> 240

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

atgggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctact caaaatggaa aaagttcacg 60
ttgacatcga agaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagtttt ccgcagtttg 120
aagtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgcaagagcg ttttcgcatc 180
ttgtttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cagatcctt gacattggaa 240

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)

<400> 21

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Thr Leu Arg Asn

1

5

10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 奥拉病毒 (Aura)

<400> 22

Gly Asp Gln Ile Leu Pro Ile Tyr Gly Arg Val Ser Val

1

5

10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 西部马脑炎病毒 (WEEV)

<400> 23

Gly Arg Val Ala Asp Ile Arg Asn Asn Thr Ile Lys Asp

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 巴马森林病毒 (BFV)

<400> 24

Gly Met Gln Ile Val Val Thr Glu Met Arg Ile Gln Arg

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 奥-奈氏病毒 (ONNV)

<400> 25

Asn Lys Gln Ile Cys Ile Thr Thr Arg Lys Val Asp Glu

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 罗斯河病毒 (RRV)

<400> 26

Gly Leu Gln Val Asn Val Pro Glu Arg Lys Val Gln Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 塞姆利基森林病毒 (SFV)

<400> 27

Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Glu Arg Lys Ile Gln Pro

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 辛德比斯病毒 (SINV)

<400> 28

Gly Thr Gln Leu Asp Leu Gln Thr Gly Arg Thr Arg Val

1 5 10

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

Gly Arg Val Tyr Asp Met Asn Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Leu

1 5 10 15

Arg Asn

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

Gly Asp Gln Ile Leu Pro Ile Thr Gly Ala Ala Ala Tyr Gly Arg Val

1 5 10 15

Ser Val

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

Gly Arg Val Ala Asp Ile Arg Thr Gly Ala Ala Ala Asn Asn Thr Ile

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

Gly Met Gln Ile Val Val Thr Thr Gly Ala Ala Ala Glu Met Arg Ile
1 5 10 15
Gln Arg
<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 33
Asn Lys Gln Ile Cys Ile Thr Thr Gly Ala Ala Ala Thr Arg Lys Val
1 5 10 15
Asp Glu
<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 34
Gly Leu Gln Val Asn Val Pro Thr Gly Ala Ala Ala Glu Arg Lys Val
1 5 10 15
Gln Pro
<210> 35
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 35
Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Thr Gly Ala Ala Ala Glu Arg Lys Ile
1 5 10 15
Gln Pro
<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 36

Gly Thr Gln Leu Asp Leu Gln Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Arg Thr

1

5

10

15

Arg Val

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

Glu Ala Ala Ala Lys

1

5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

Gly Cys Gly Arg Thr

1

5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

Thr Gly Ala Ala Ala

1

5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 40

Leu Arg Pro His Pro

1 5
 <210> 41
 <211> 1273
 <212> PRT
 <213> SARS-CoV-2
 <400> 41
 Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe
 20 25 30
 Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu
 35 40 45
 His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp
 50 55 60
 Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
 85 90 95
 Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser
 100 105 110
 Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile
 115 120 125
 Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr
 130 135 140
 Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr
 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu
 165 170 175
 Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe
 180 185 190
 Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr
 195 200 205
 Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu
 210 215 220
 Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser
 245 250 255
 Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro

260	265	270
Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala		
275	280	285
Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys		
290	295	300
Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val		
305	310	315
Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys		
325	330	335
Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala		
340	345	350
Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu		
355	360	365
Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro		
370	375	380
Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe		
385	390	395
Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly		
405	410	415
Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys		
420	425	430
Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn		
435	440	445
Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe		
450	455	460
Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys		
465	470	475
Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly		
485	490	495
Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val		
500	505	510
Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys		
515	520	525
Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn		
530	535	540
Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu		
545	550	555
Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val		
565	570	575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe		
580	585	590
Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val		
595	600	605
Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile		
610	615	620
His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser		
625	630	635
Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val		
645	650	655
Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala		
660	665	670
Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala		
675	680	685
Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser		
690	695	700
Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile		
705	710	715
Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val		
725	730	735
Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu		
740	745	750
Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr		
755	760	765
Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln		
770	775	780
Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe		
785	790	795
Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser		
805	810	815
Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly		
820	825	830
Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp		
835	840	845
Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu		
850	855	860
Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly		
865	870	875
Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile		

	885		890		895
Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr					
	900		905		910
Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn					
	915		920		925
Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala					
	930		935		940
Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn					
945		950		955	960
Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val					
	965		970		975
Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln					
	980		985		990
Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val					
	995		1000		1005
Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu					
	1010		1015		1020
Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val					
1025		1030		1035	1040
Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala					
	1045		1050		1055
Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu					
	1060		1065		1070
Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His					
	1075		1080		1085
Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val					
	1090		1095		1100
Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr					
1105		1110		1115	1120
Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr					
	1125		1130		1135
Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu					
	1140		1145		1150
Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp					
	1155		1160		1165
Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp					
	1170		1175		1180
Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu					
1185		1190		1195	1200

Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Ile	Lys	Trp	Pro	Trp	Tyr	Ile		
1205						1210						1215					
Trp	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Gly	Leu	Ile	Ala	Ile	Val	Met	Val	Thr	Ile		
1220						1225						1230					
Met	Leu	Cys	Cys	Met	Thr	Ser	Cys	Cys	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Cys	Cys		
1235						1240						1245					
Ser	Cys	Gly	Ser	Cys	Cys	Lys	Phe	Asp	Glu	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro	Val		
1250						1255						1260					
Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	His	Tyr	Thr									
1265						1270											
<210> 42																	
<211> 216																	
<212> PRT																	
<213> SARS-CoV-2																	
<400> 42																	
Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Gly		
1				5				10				15					
Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Pro	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro		
20						25						30					
Phe	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Thr	Arg	Phe	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	Trp		
35						40						45					
Asn	Arg	Lys	Arg	Ile	Ser	Asn	Cys	Val	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr		
50				55				60									
Asn	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys	Cys	Tyr	Gly	Val	Ser	Pro	Thr		
65				70				75				80					
Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Thr	Asn	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Val		
85						90						95					
Ile	Arg	Gly	Asp	Glu	Val	Arg	Gln	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Gly	Lys		
100						105						110					
Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Thr	Gly	Cys	Val		
115						120						125					
Ile	Ala	Trp	Asn	Ser	Asn	Asn	Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Gly	Gly	Asn	Tyr		
130						135						140					
Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Leu	Phe	Arg	Lys	Ser	Asn	Leu	Lys	Pro	Phe	Glu		
145						150						155				160	
Arg	Asp	Ile	Ser	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Cys	Asn		
165						170						175					
Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Asn	Cys	Tyr	Phe	Pro	Leu	Gln	Ser	Tyr	Gly	Phe		
180						185						190					

Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu
 195 200 205
 Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro
 210 215
 <210> 43
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> SARS-CoV-2
 <400> 43
 Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Pro
 1 5 10 15
 Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg
 20 25 30
 Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val
 35 40 45
 Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys
 50 55 60
 Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile
 85 90 95
 Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro
 100 105 110
 Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp
 115 120 125
 Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys
 130 135 140
 Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln
 145 150 155 160
 Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln
 180 185 190
 Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Trp
 195 200 205
 Tyr Ile Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val
 210 215 220
 Thr Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly
 225 230 235 240

Cys Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu
 245 250 255
 Pro Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
 260 265
 <210> 44
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> SARS-CoV-2
 <400> 44
 Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr
 1 5 10 15
 Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys
 20 25 30
 Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe
 35 40 45
 Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr
 50 55 60
 Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln
 65 70 75 80
 Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu
 85 90 95
 Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu
 100 105 110
 Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg
 115 120 125
 Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr
 130 135 140
 Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr
 165 170 175
 Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro
 180 185 190

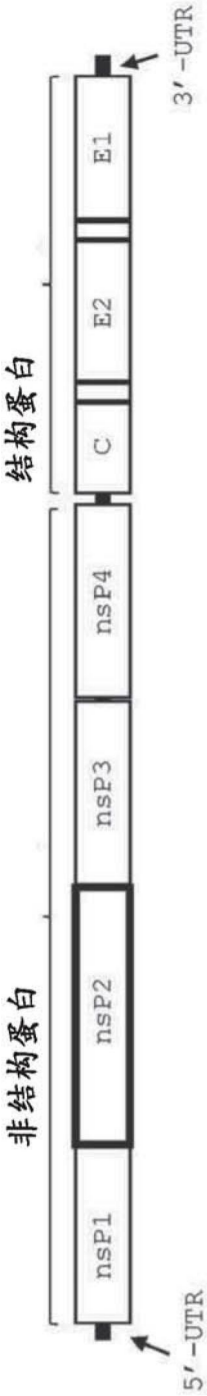


FIG.1A

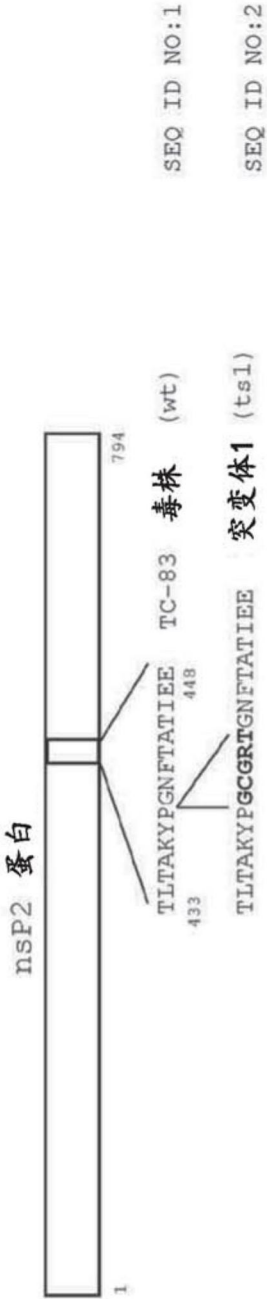


FIG.1B

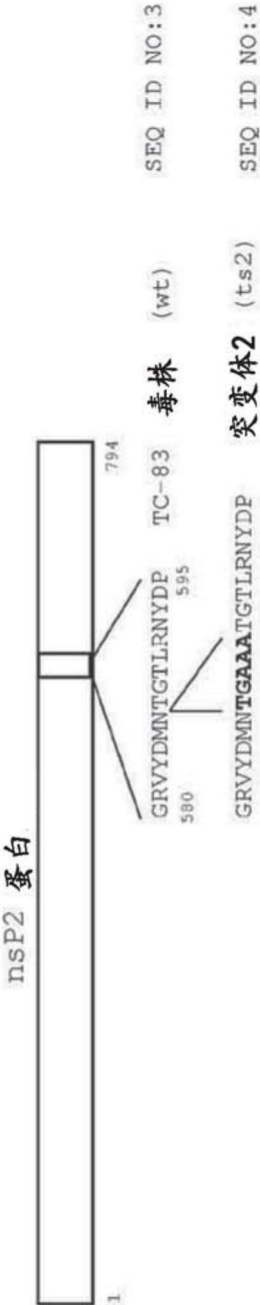


FIG.1C

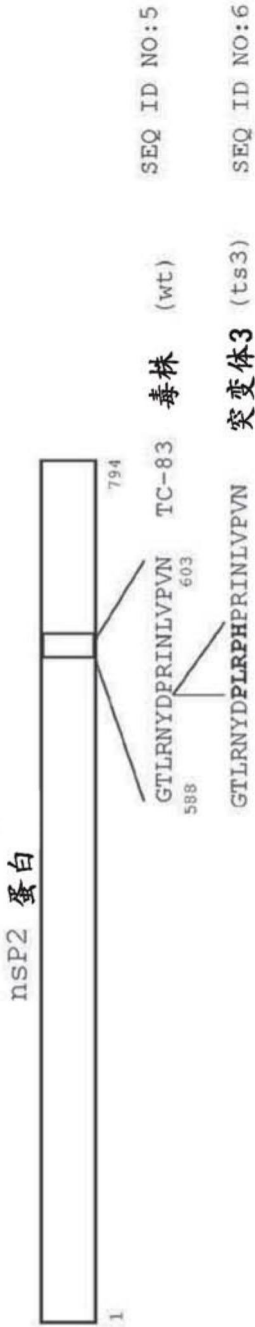


FIG.1D

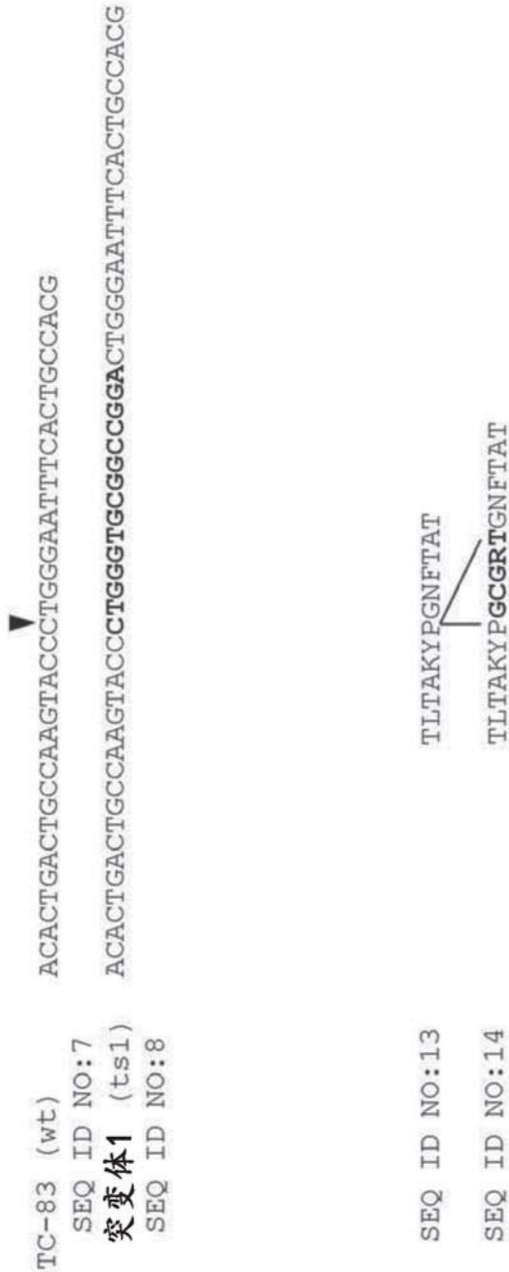


FIG.2A

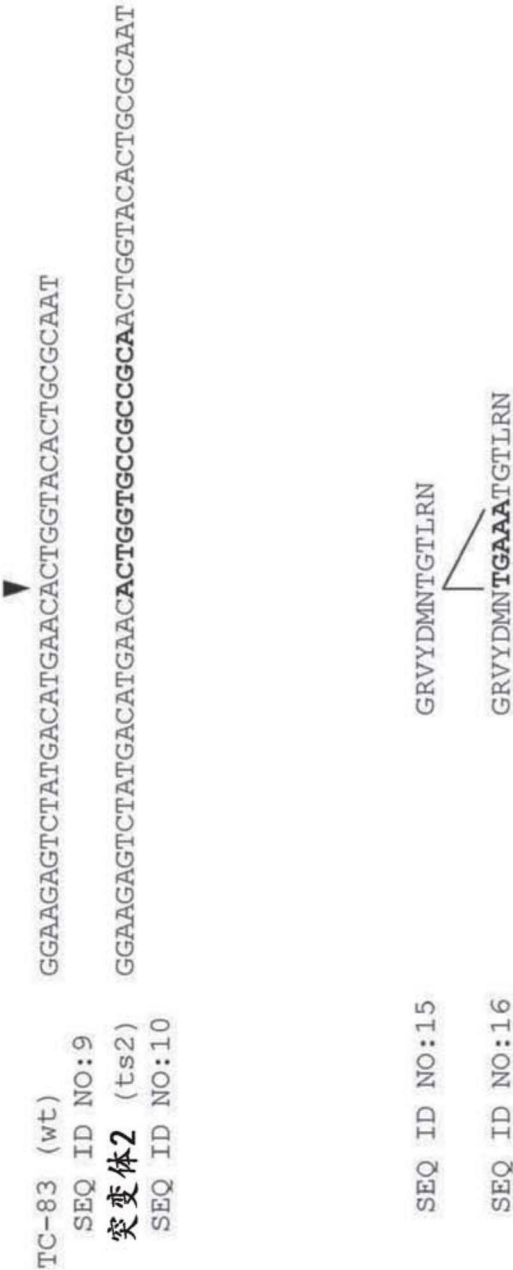


FIG.2B

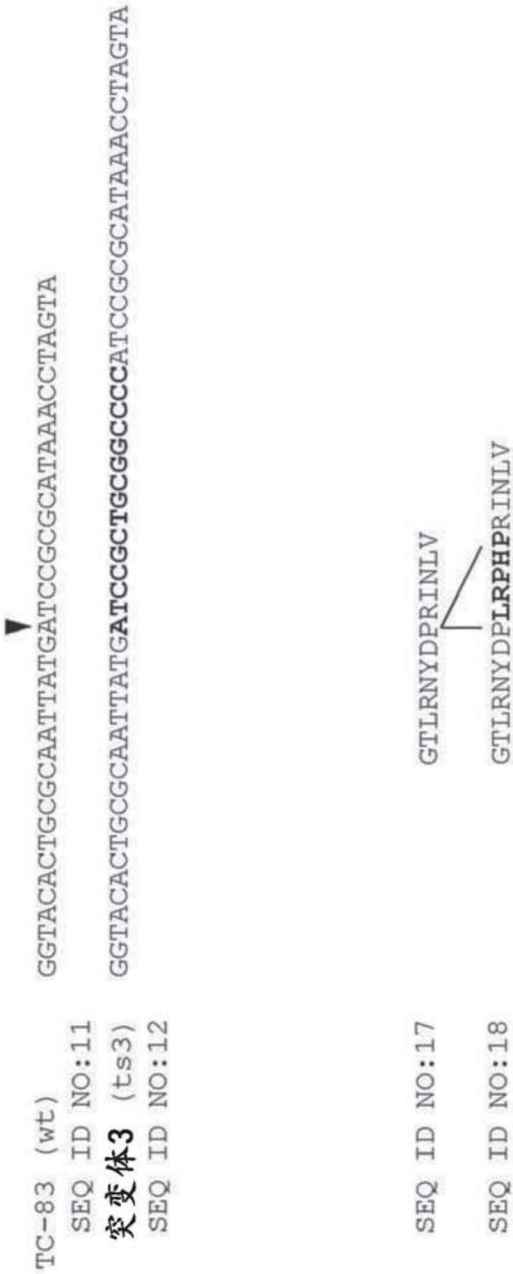


FIG.2C

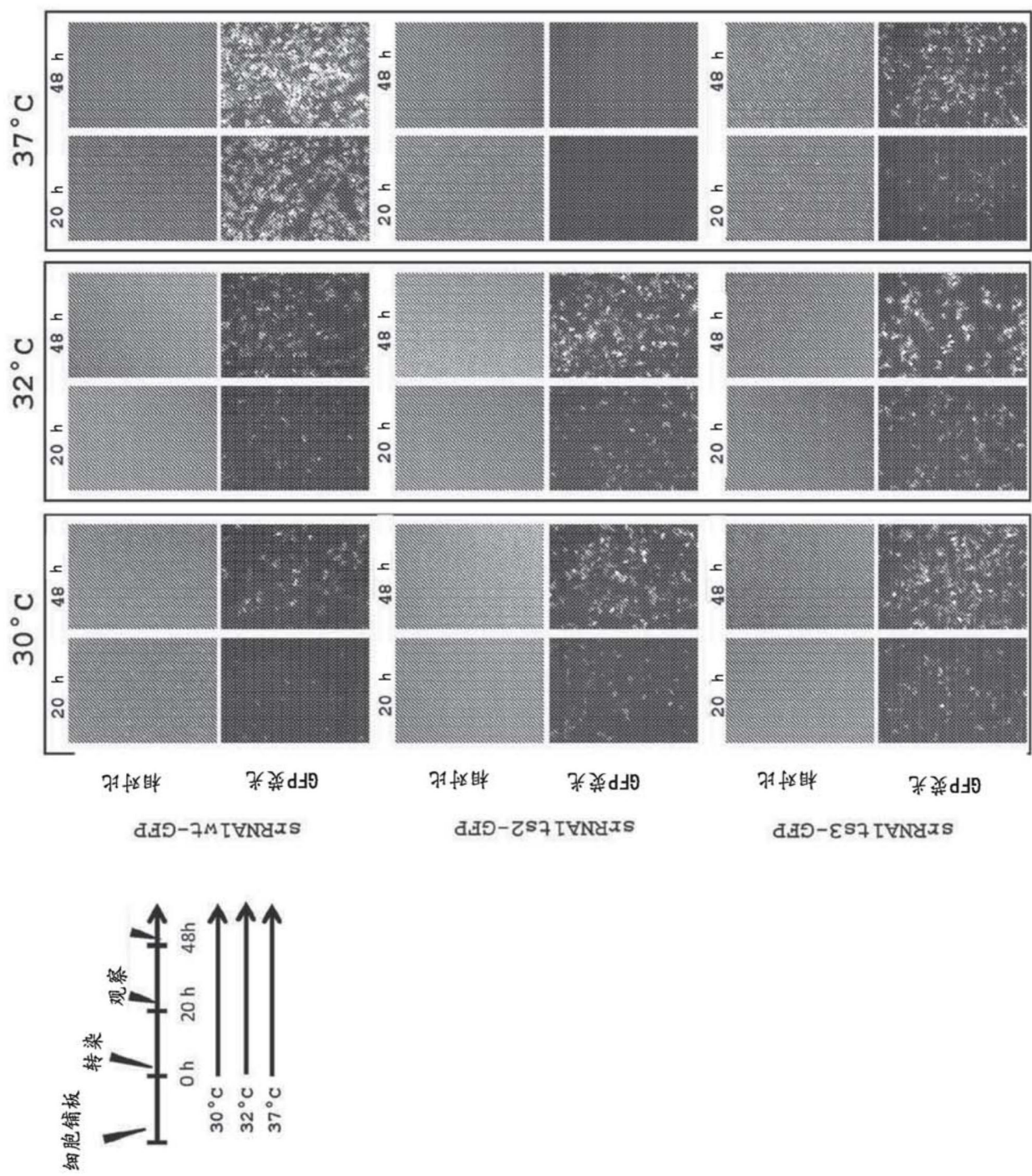


FIG.4A

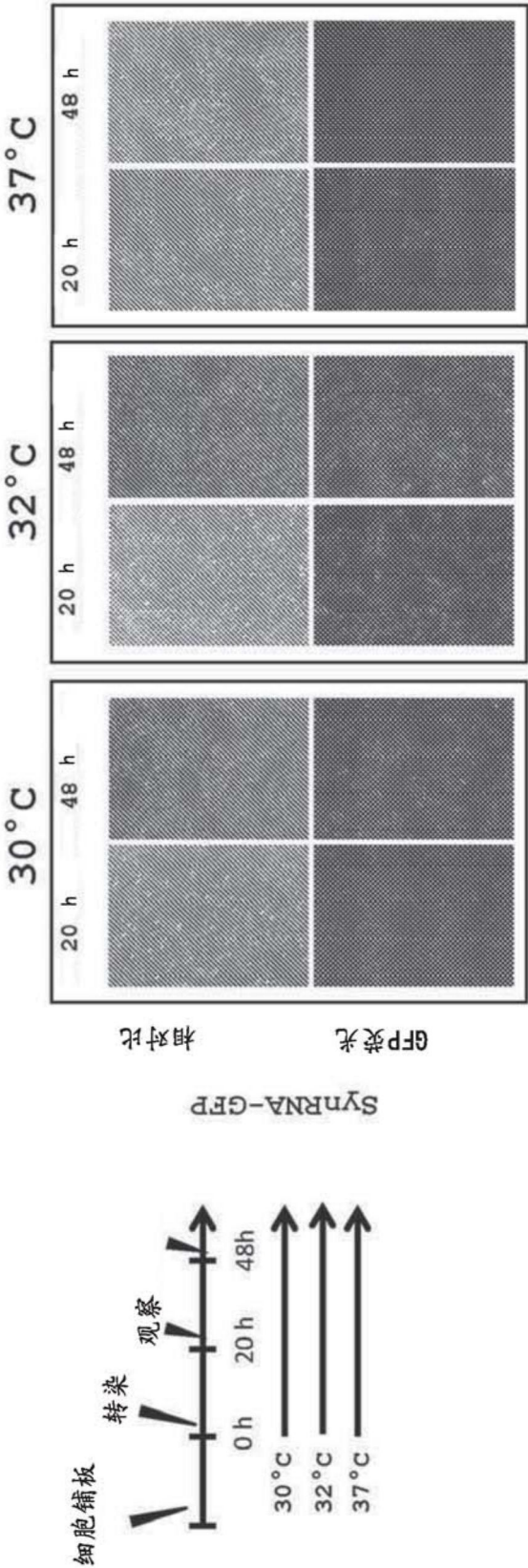


FIG. 4B

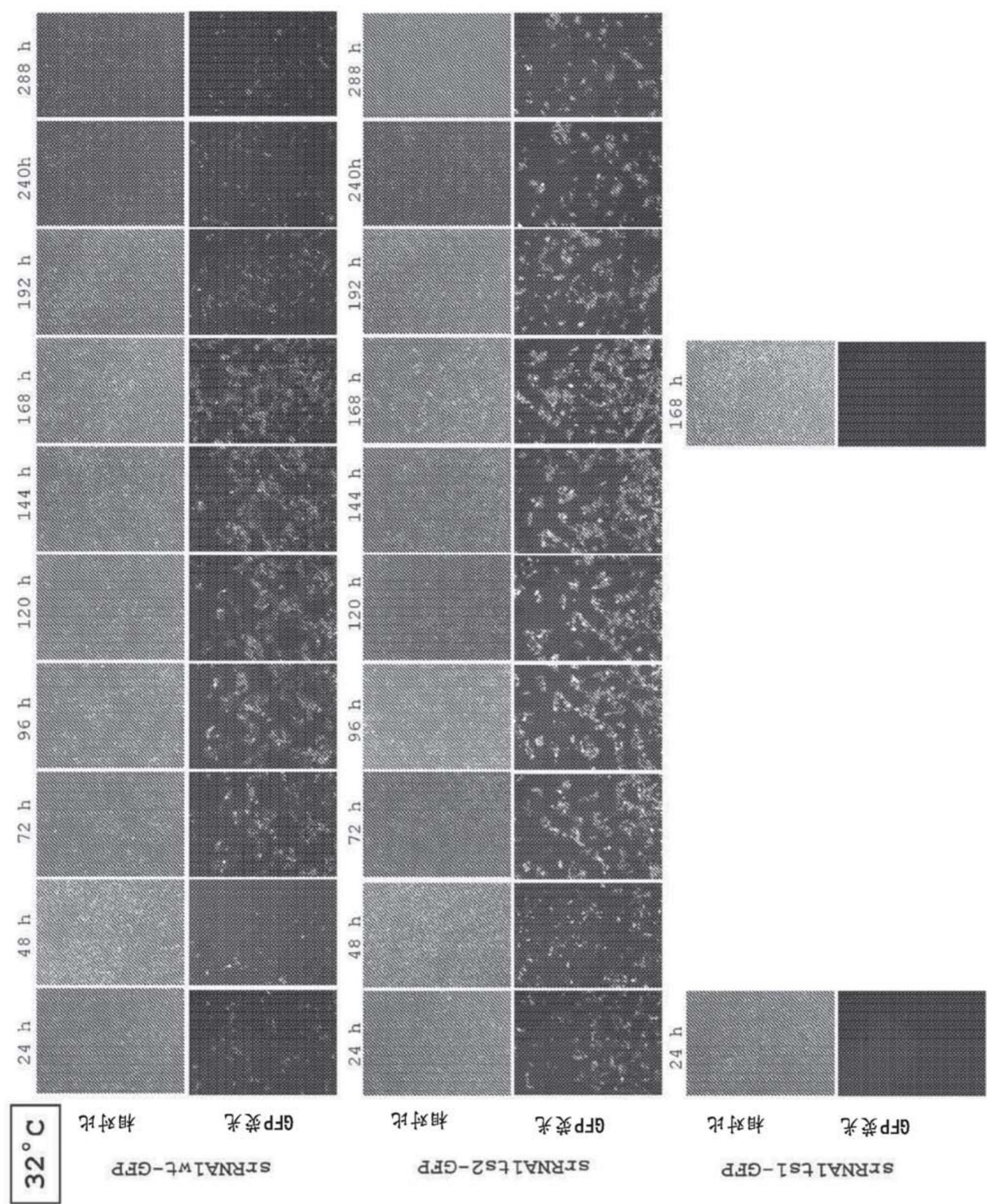


FIG.5

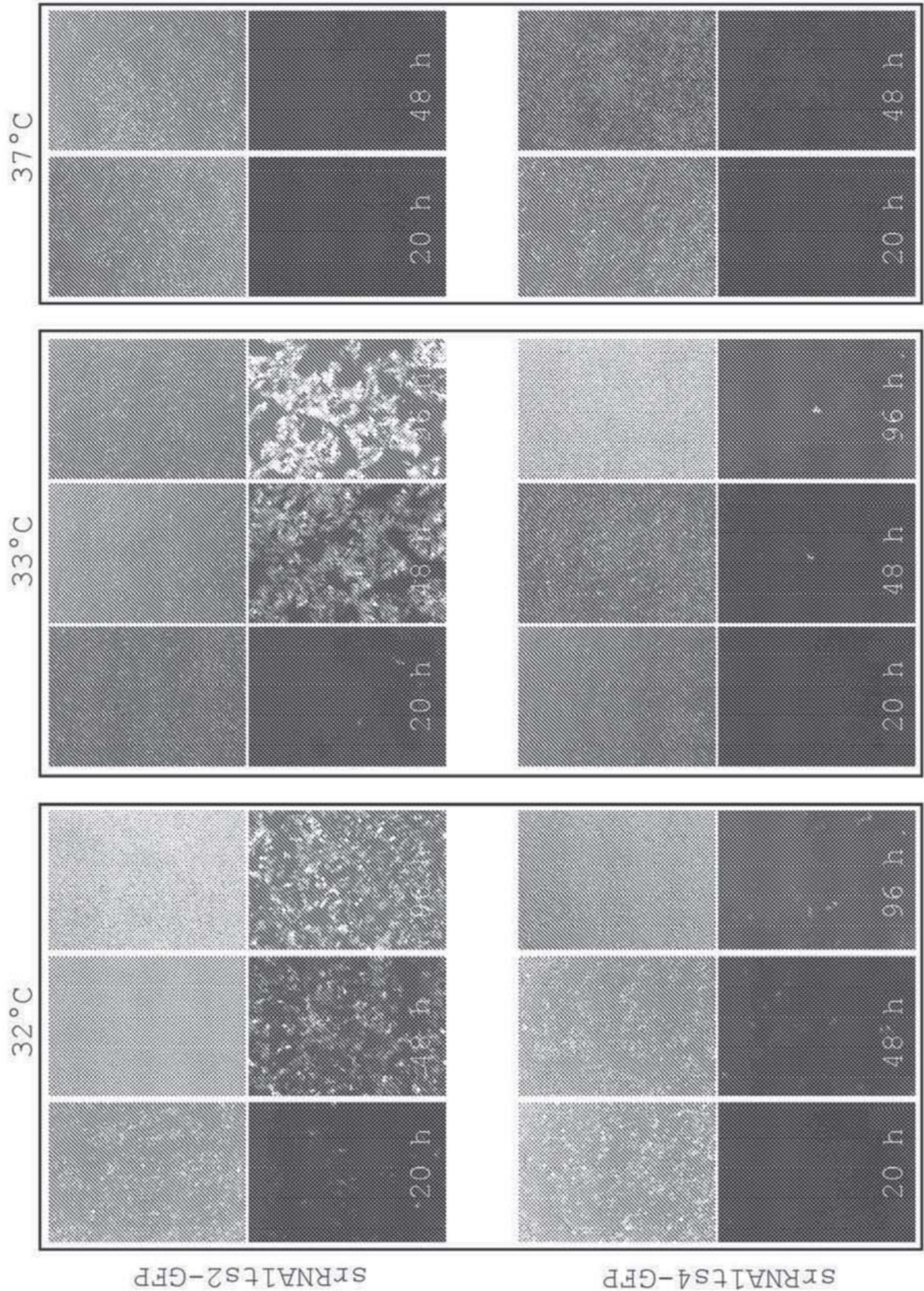


FIG.6

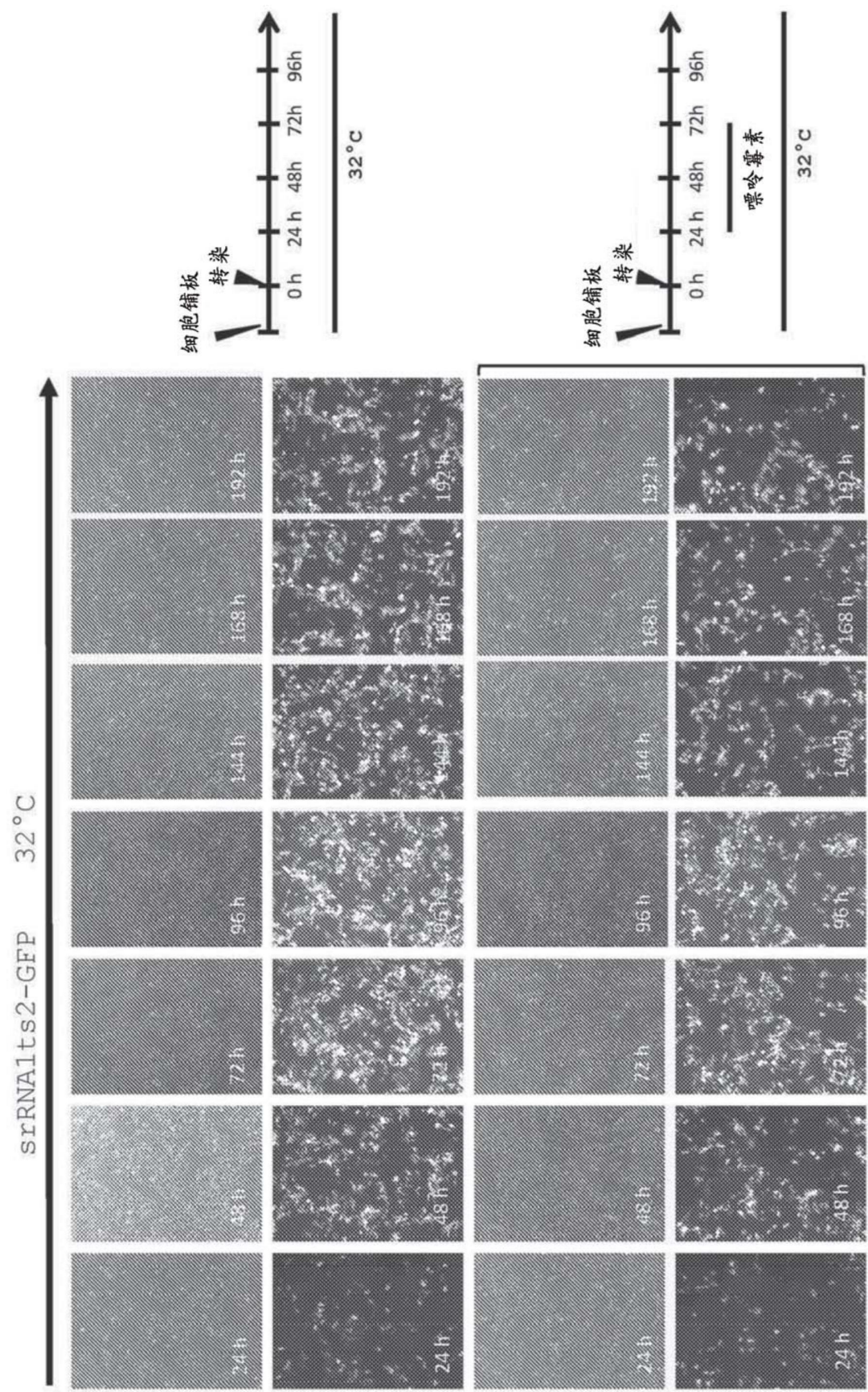


FIG.7

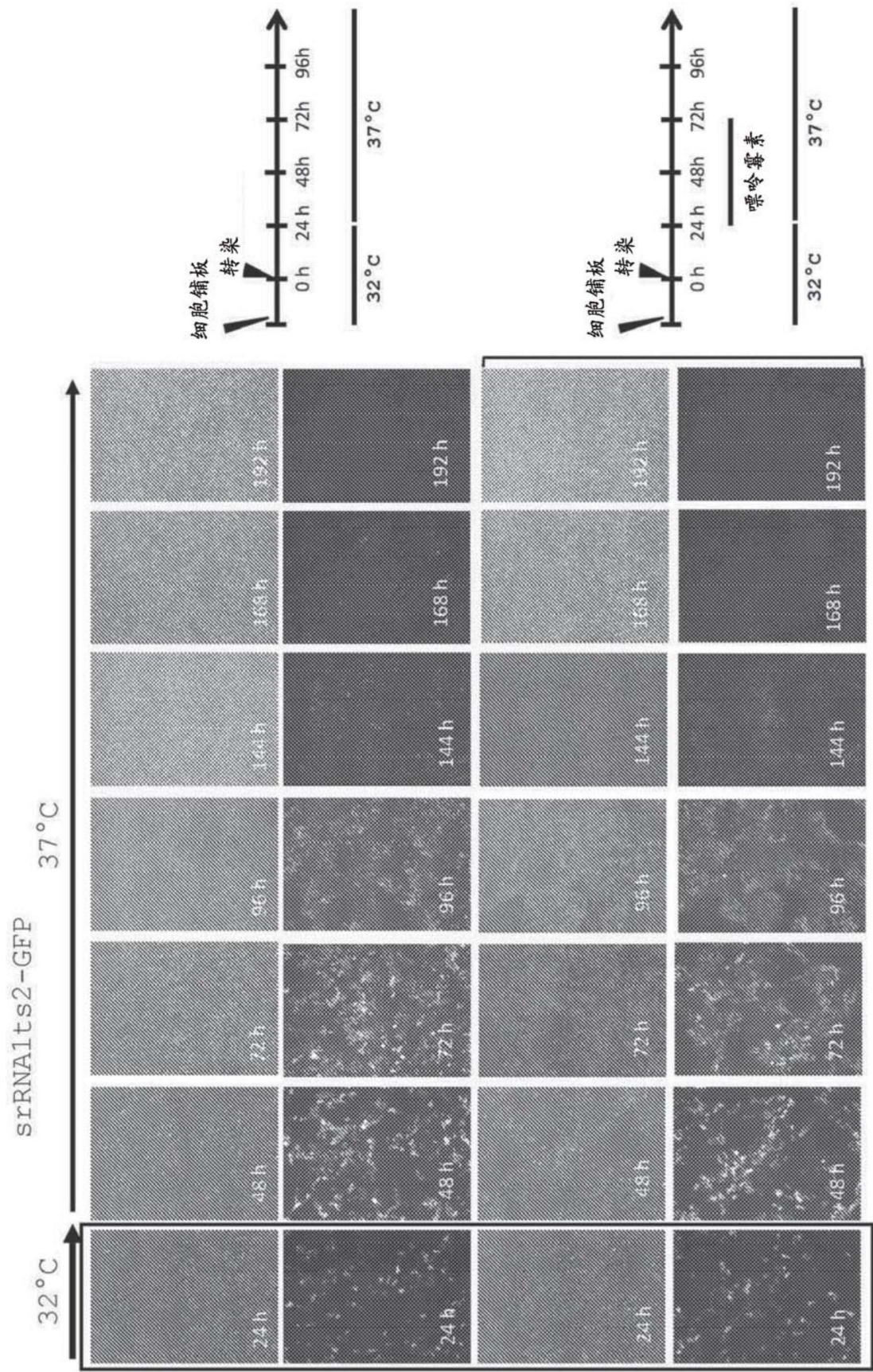


FIG.8

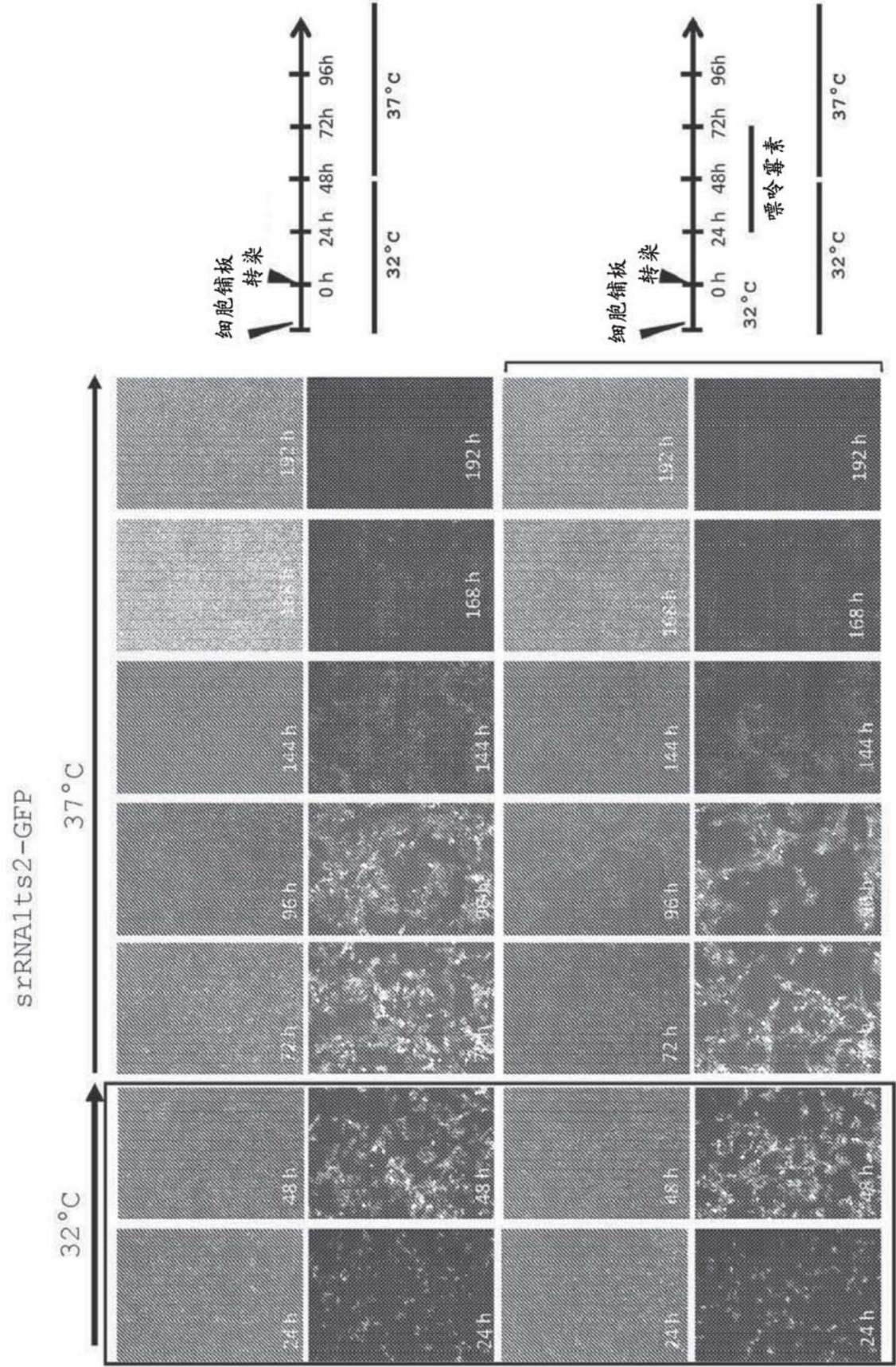


FIG.9

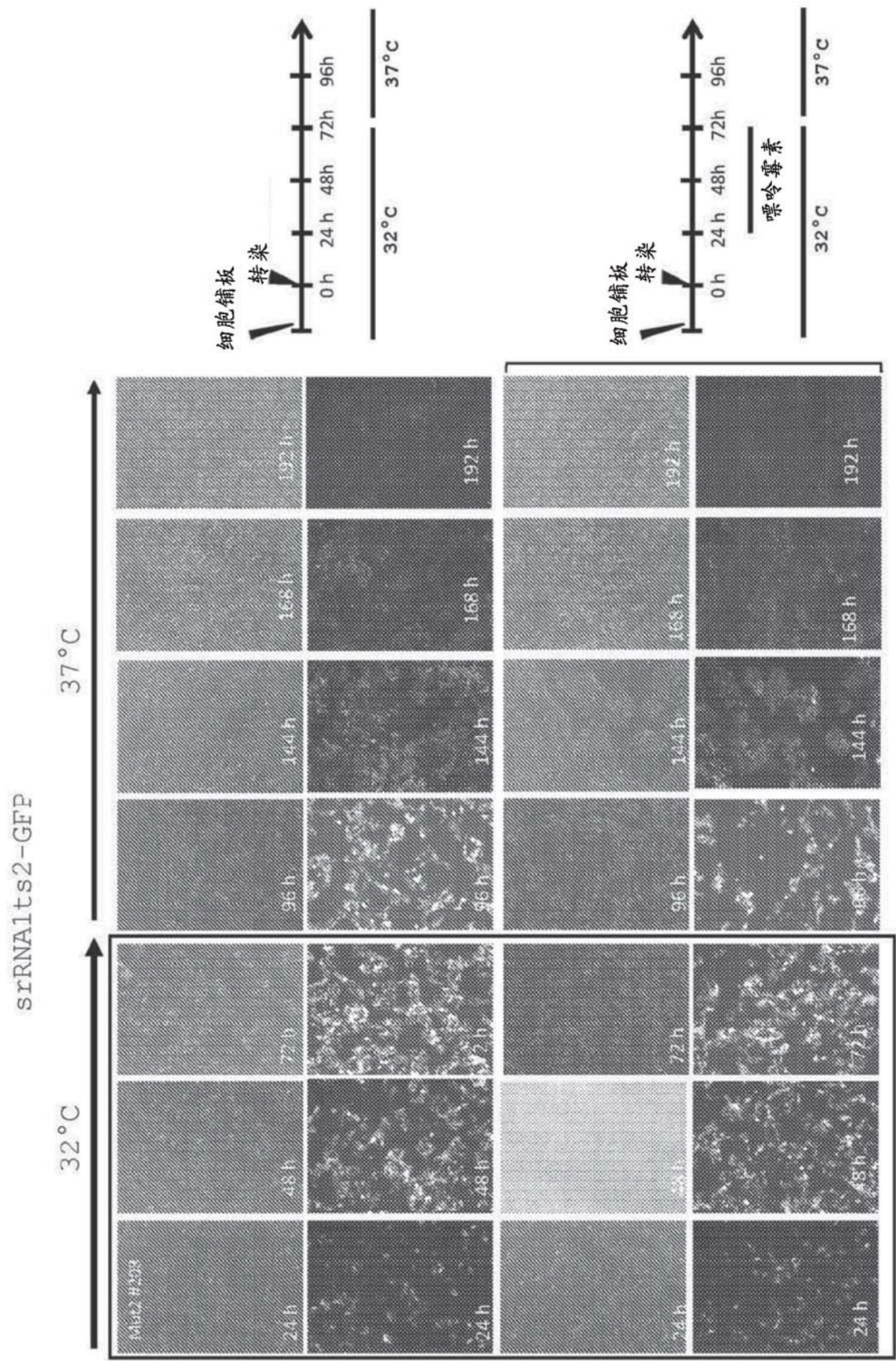


FIG.10

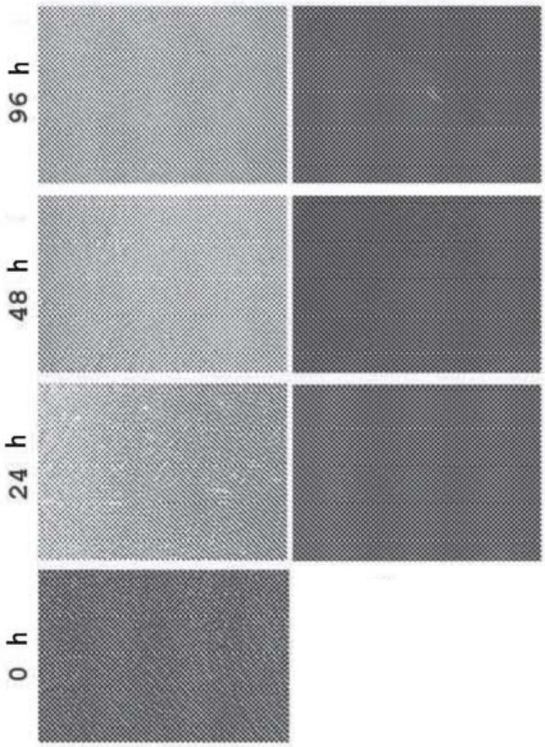


FIG.11A

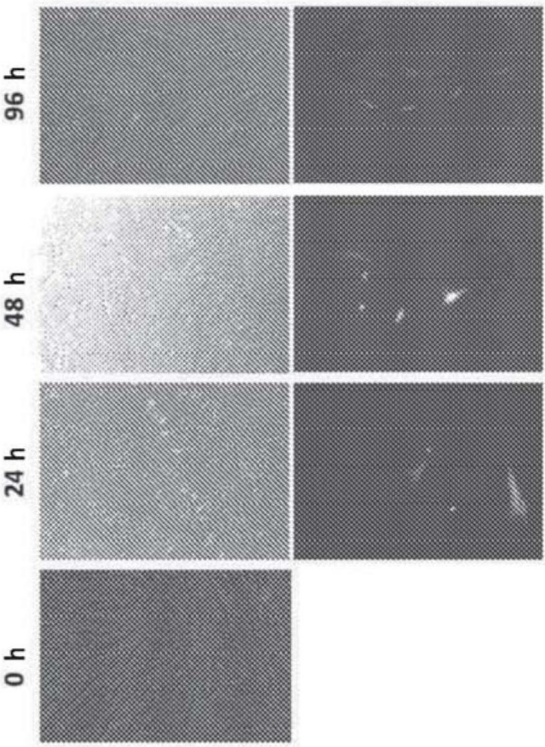


FIG.11B

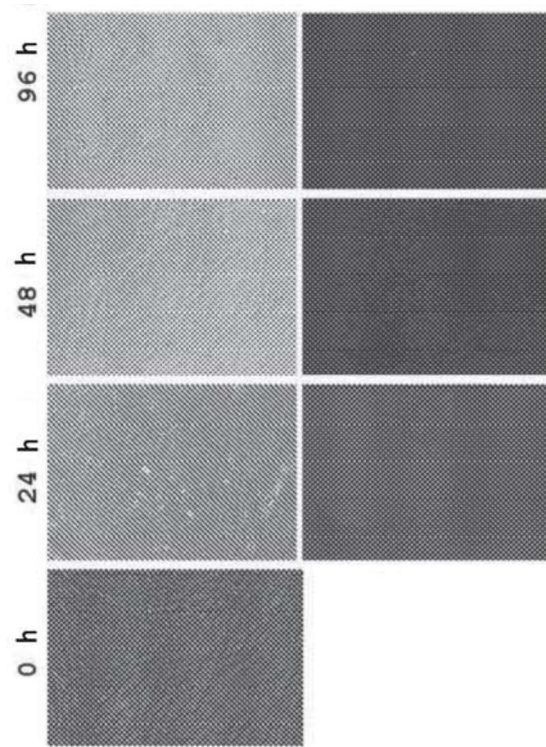


FIG. 11C

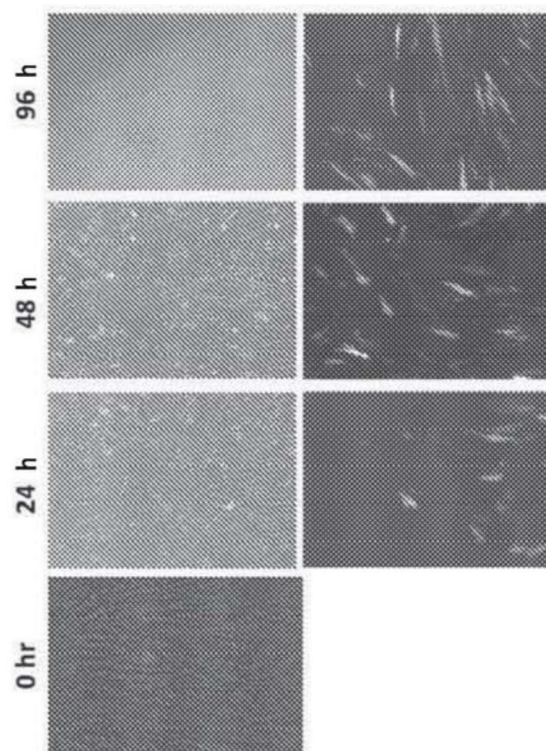


FIG. 11D

[illegible]

FIG. 12

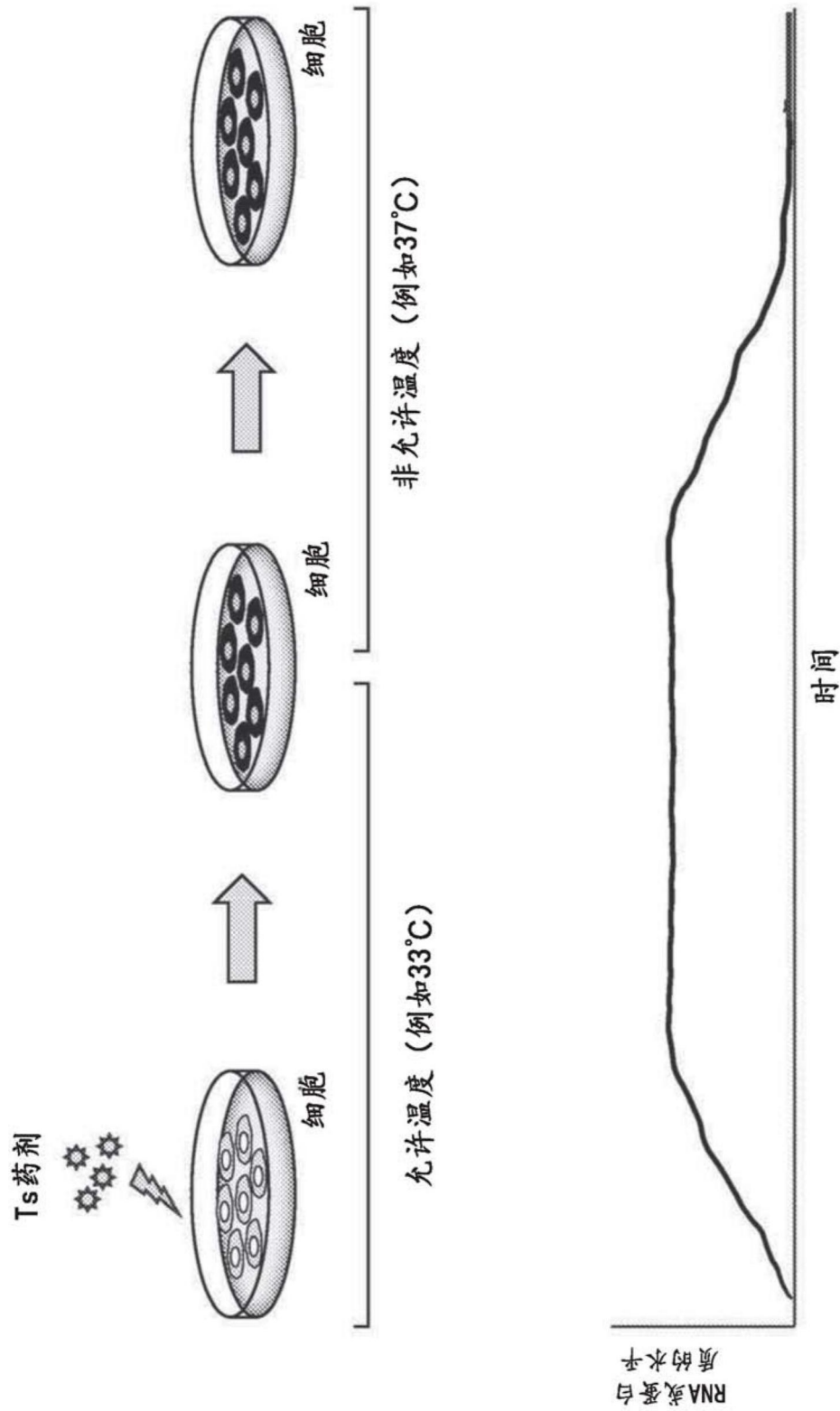


FIG.13

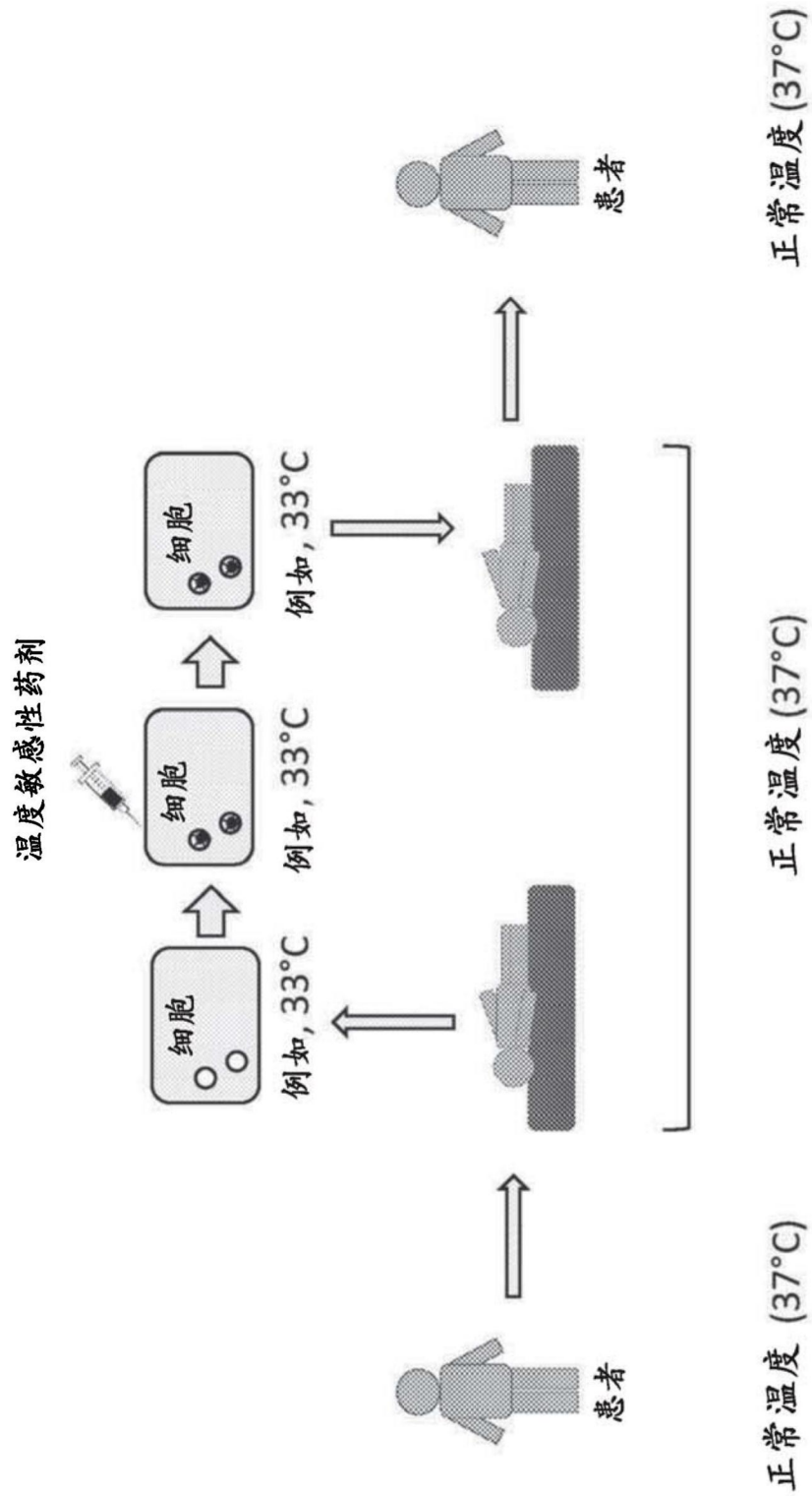


FIG.14

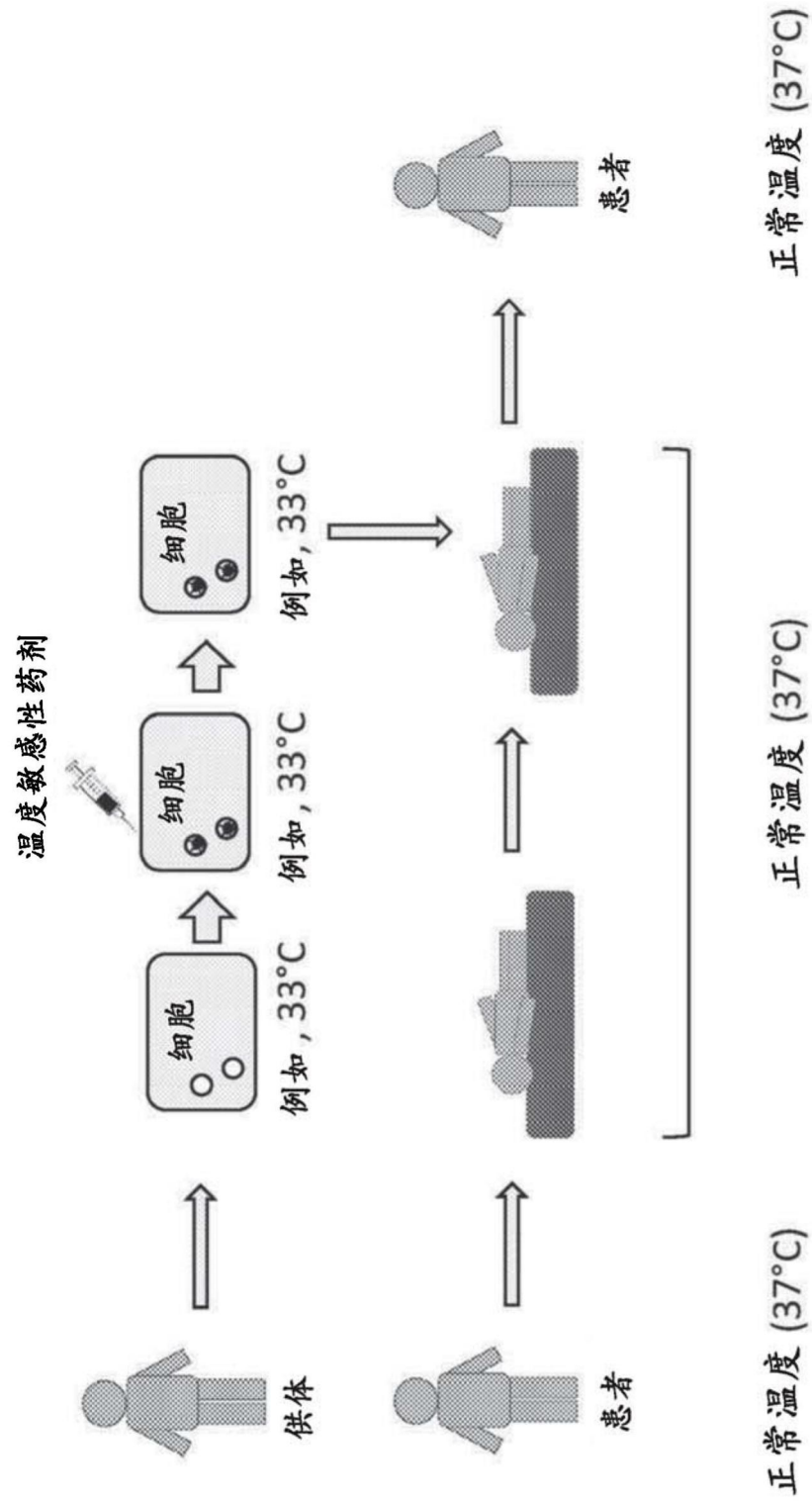


FIG.15

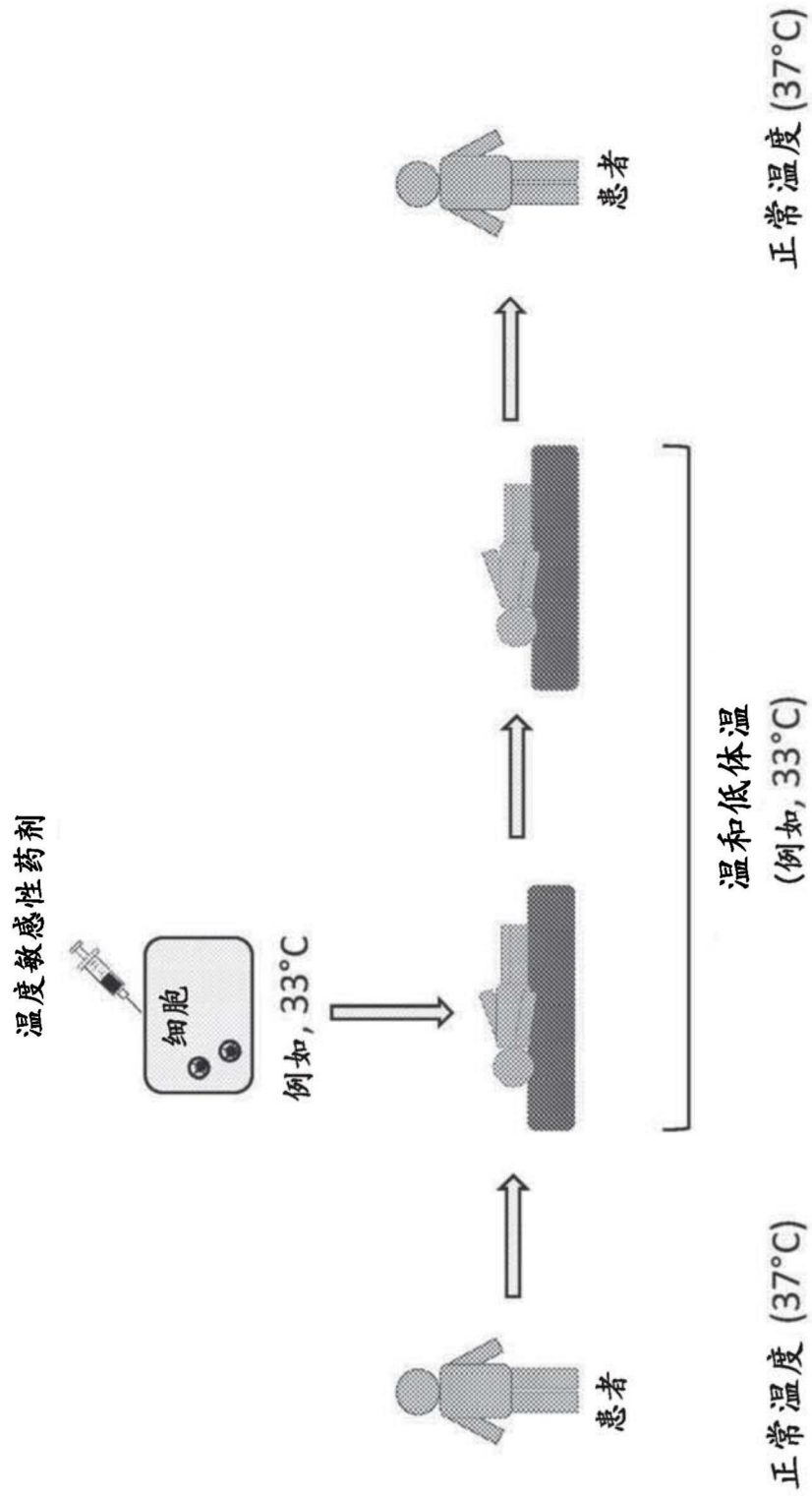


FIG.16

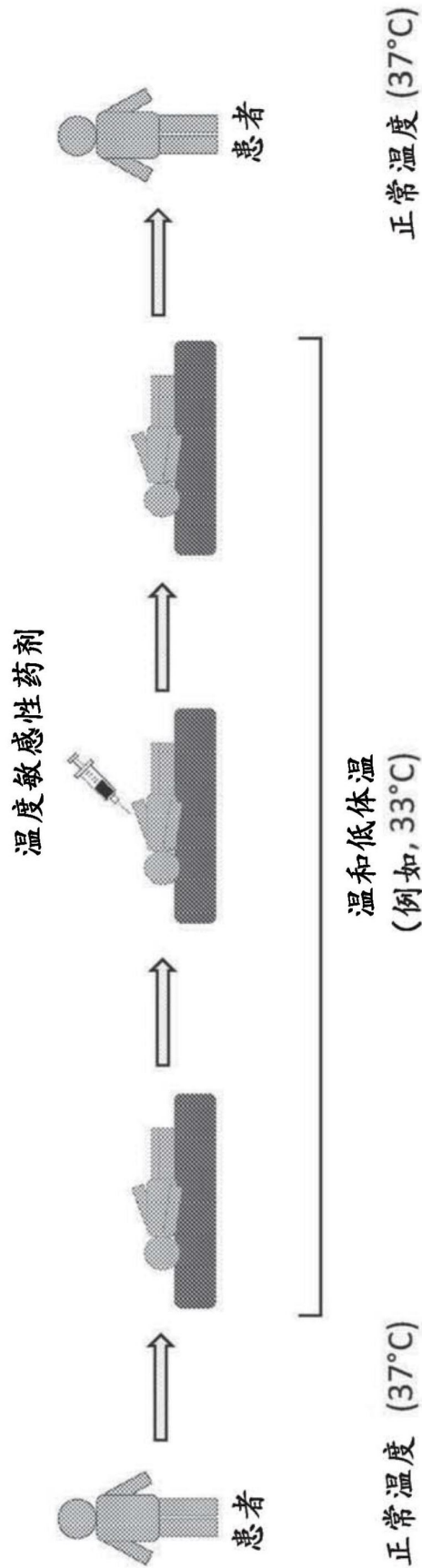


FIG.17

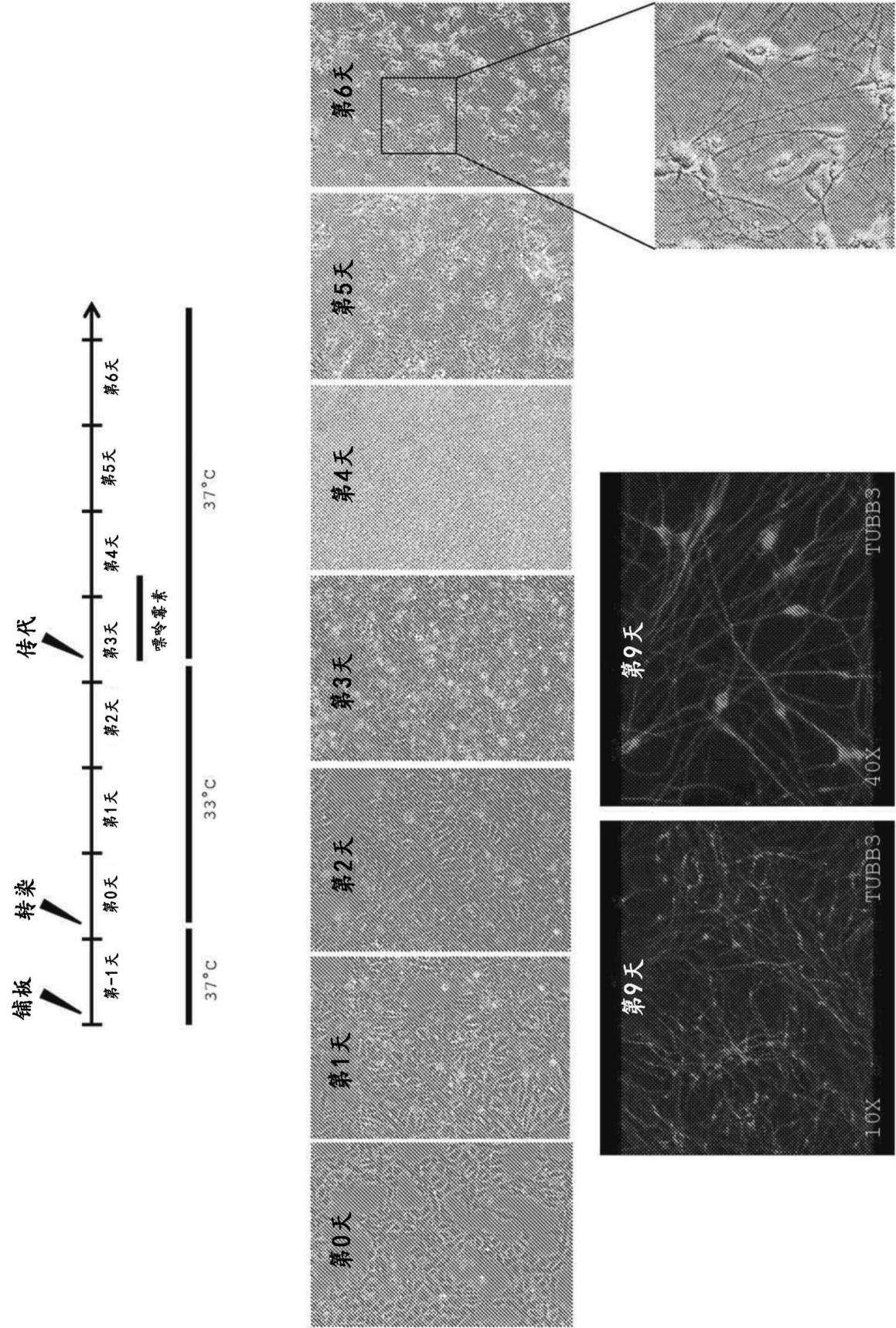


FIG.18

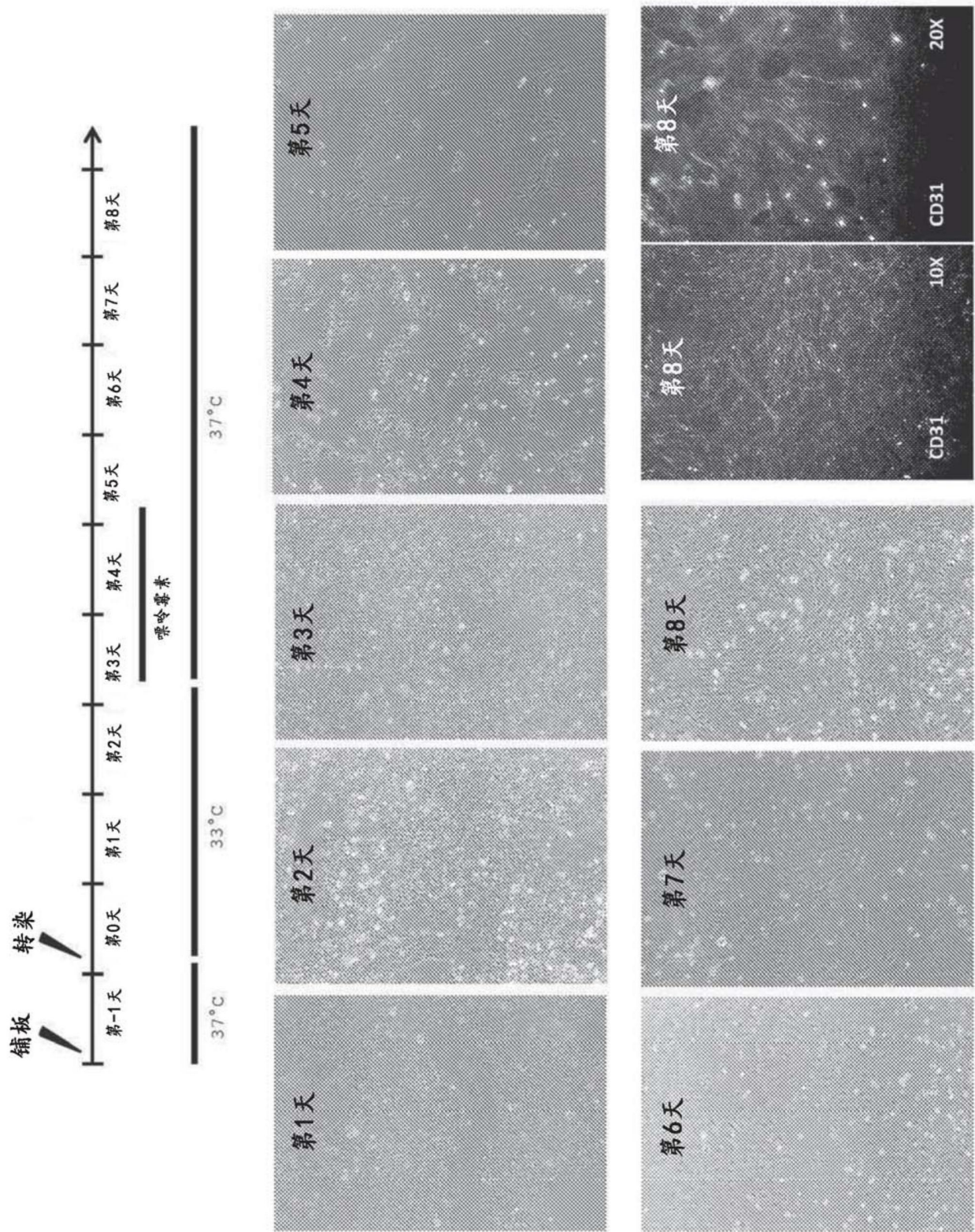


FIG.19

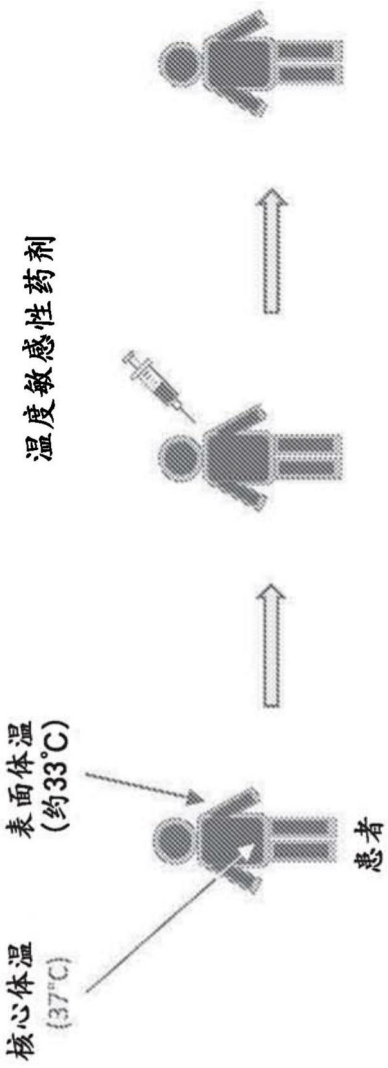


FIG.20

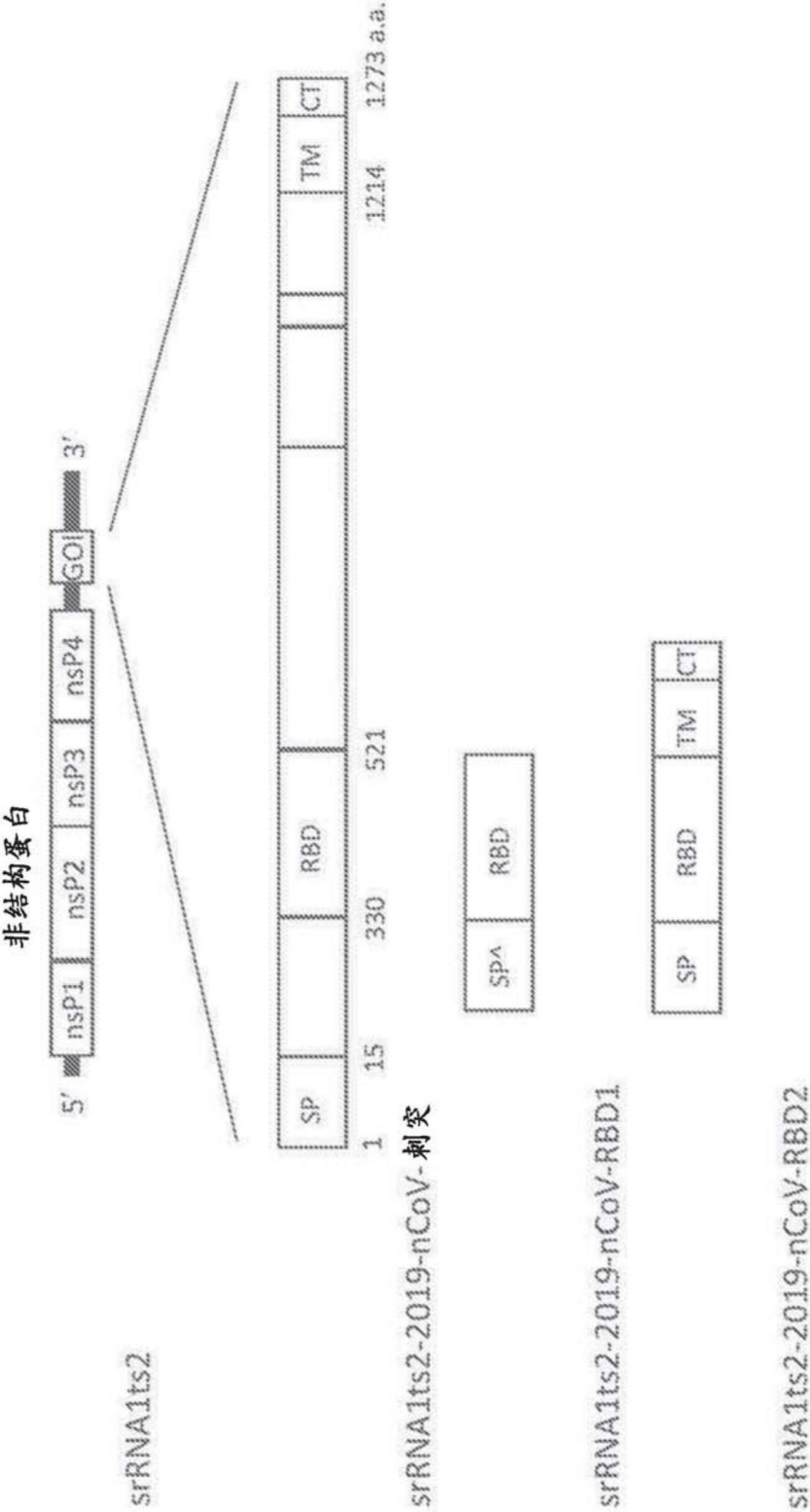


FIG.21

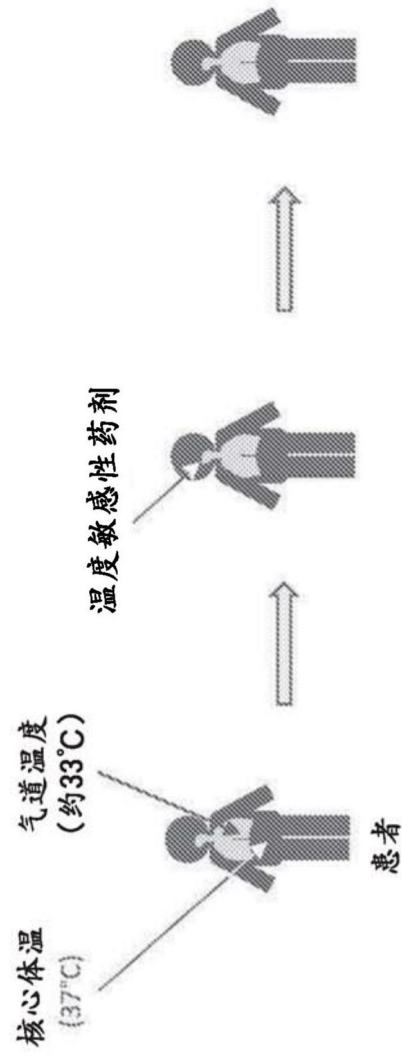


FIG.22

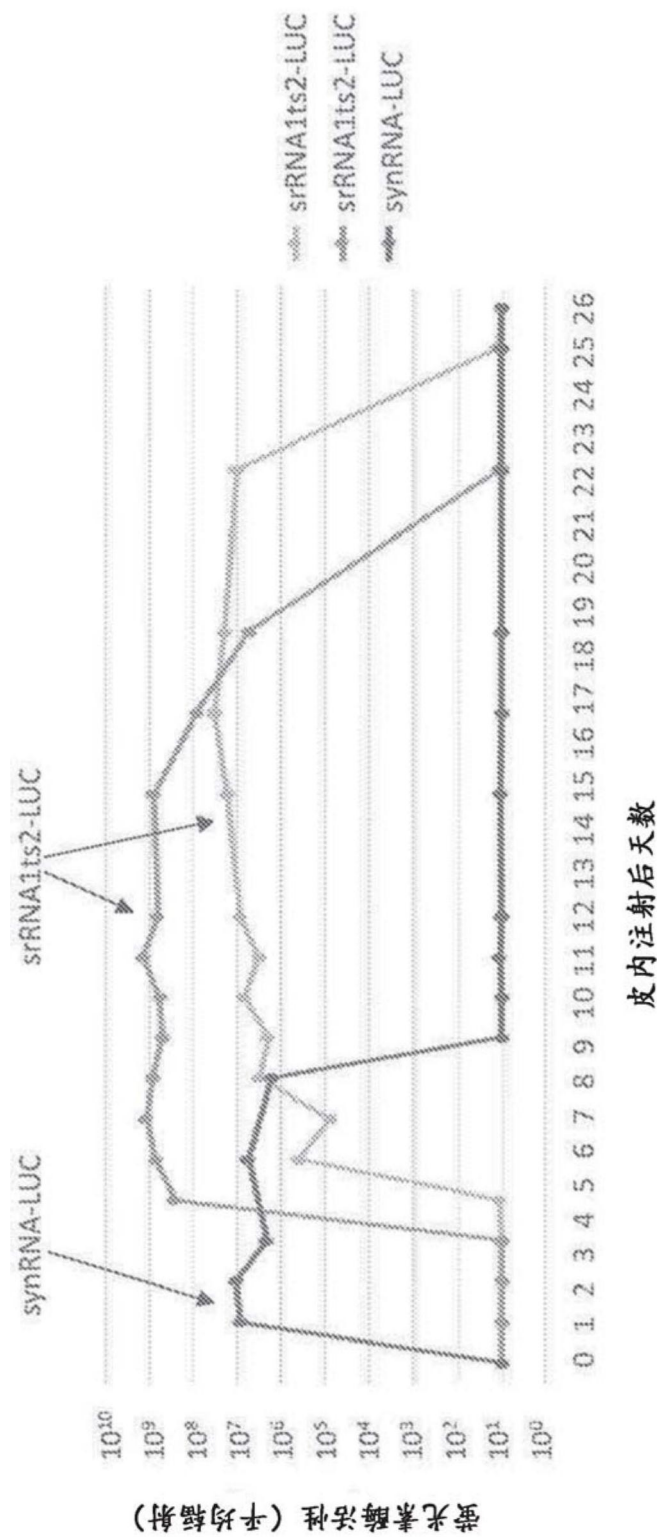


FIG.23

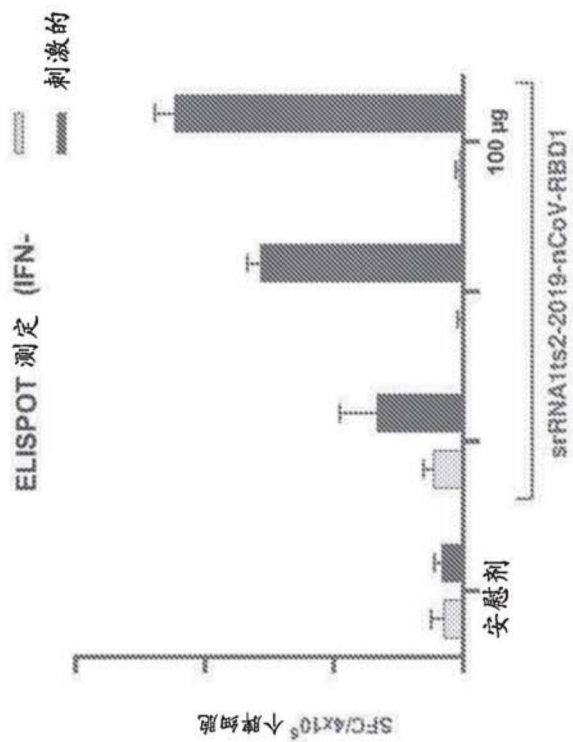


FIG.24A

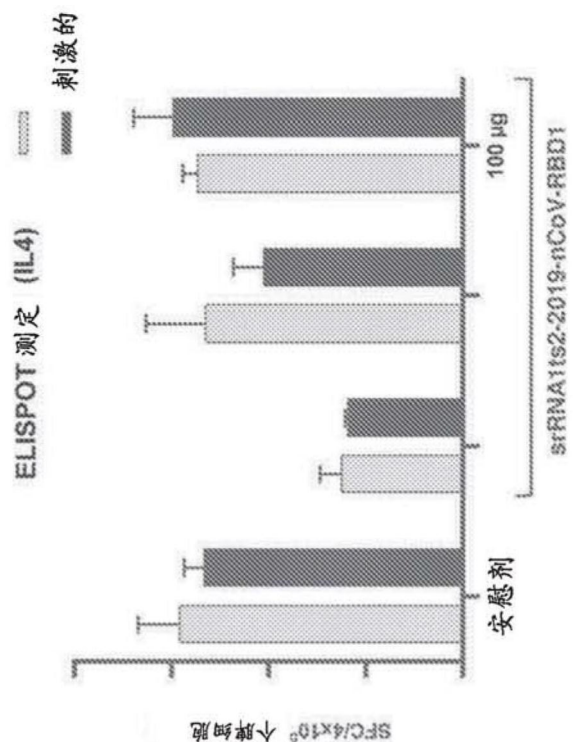


FIG.24B

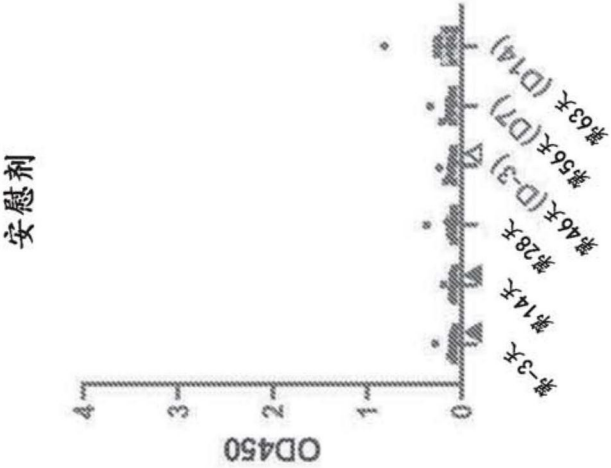


FIG.25A

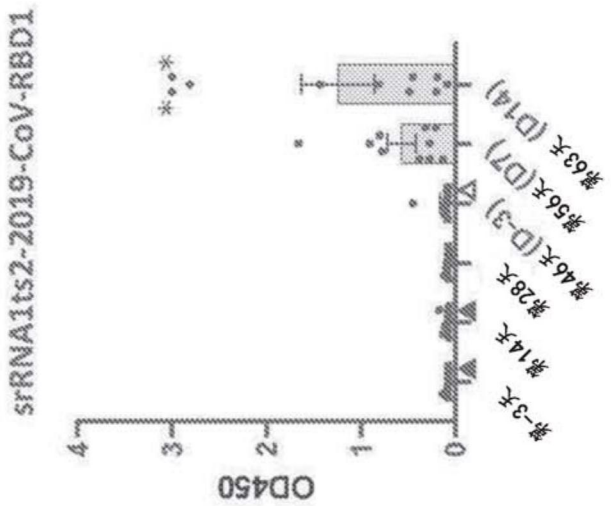


FIG.25B

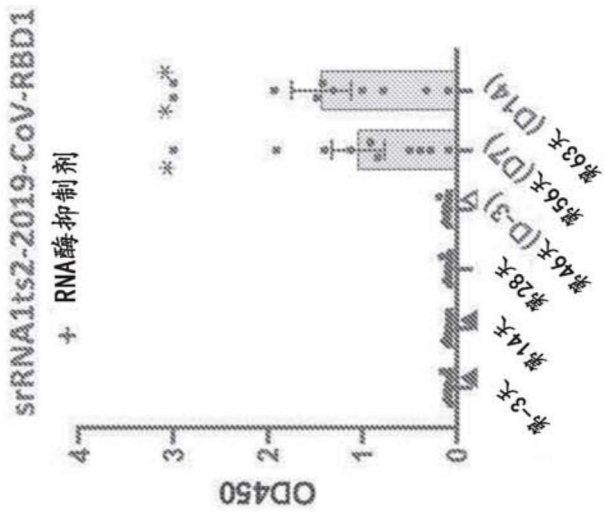


FIG.25C